

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Estudio de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen
TLR9 en dos poblaciones con enfermedad inflamatoria
intestinal (eii) del sur de Brasil**

TESIS

para optar al título profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Jacqueline María Valverde Villegas

ASESOR

Lenin Maturrano Hernández

Lima – Perú

2011

*“El que no arriesga no gana....y el que sí...
puede perder pero ganar mucho más.
.....AYYYY.... quién entiende a los adultos..!!”*

MAFALDA

A mis padres:

William y María Elena

AGRADECIMIENTOS

El profundo agradecimiento a mis padres: William y María Elena, quienes siempre confiaron en mí y me respaldaron en todo momento, sin el apoyo incondicional de ellos no hubiera sido posible lograr este objetivo.

Al Dr. José A. Bogo Chies de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur, por abrirme las puertas de su equipo de investigación y la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo.

Mi especial agradecimiento a Bruno Paiva, mi co-asesor en Brasil, porque me enseñó que para hacer buena investigación y buena amistad, hay que ser solidarios, pacientes y leales.

A todo el equipo del Laboratorio de Inmunogenética de la UFRGS, cada uno de ellos me acogió con mucho cariño y respeto, prestos a ayudarme en todo lo que necesité. Mencionar de forma especial a Gaby y Paula, quienes me ayudaron en la parte final de este trabajo.

De manera muy especial agradecer al Dr. Lenin Maturrano H., por sus sabios consejos, quién me dio la oportunidad de equivocarme, me brindó su confianza y me alentó para seguir adelante. Gracias a él descubrí lo que realmente quiero hacer en este mundo de la Genética y Biología Molecular, encontré en él no sólo a un excelente profesor sino también a un amigo.

Quiero dedicar unas líneas a la persona que hoy en día es muy especial en mi vida y que hace que cada día sea distinto al anterior, a mí enamorado Frank, quien con sus palabras de experiencia y dulce compañía apaciguó los momentos de ansiedad por los que pasé en la parte final de esta etapa.

Finalmente, muchas gracias a ti, por tus sabias y cálidas palabras en el momento justo y no, siempre estaré eternamente agradecida por tu compañía física o tácita pero incondicional en esta gran aventura, todo hubiera sido más difícil sin ti.

ABREVIATURAS

APS	Ammonium peroxosulphate
CpG	Cytosine phosphate guanosine
CPA	Célula presentadora de antígeno
ADN	Ácido dexosiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleósidos tri-fosfato
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Single nucleotide polymorphisms
TBE	Tris/Borate/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
U	Unidades
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar
μL	Microlitro

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ABREVIATURAS	v
INDICE	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	Xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Características de la enfermedad inflamatoria intestinal	3
2.1.1 La enfermedad de Crohn	3
2.1.2 La colitis ulcerativa	3
2.1.3 Manifestaciones no intestinales	4
2.2 Epidemiología	5
2.3 Factores inmunológicos	7
2.4 Genes de susceptibilidad	8
2.5 Receptores tipo Toll (TLRs)	10
2.6 TLRs en el desarrollo de la EII	11
2.6.1 Base genética de la EII y el TLR9	13
2.7 El gen <i>TLR9</i>	15
2.7.1 Polimorfismos del gen TLR9 en la EII	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Materiales	19
5.1.1 Pacientes	19
5.1.2 Controles	20

5.2. Métodos	20
5.2.1 Extracción de ADN	20
5.2.2 Genotipificación	21
5.2.3 Registro de datos	25
5.2.4 Análisis estadístico	25
5.2.5 Clasificación por grupos de estudio	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Genotipificación	27
6.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg	28
6.3. Frecuencias alélicas y genotípicas	30
6.3.1 GRUPO 1 (PUCRS)	30
6.3.2 GRUPO 2 (HCPA)	33
6.3.3 GRUPO 3 (PUCRS Y HCPA)	35
6.4. Análisis de haplotipos	37
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	45
9. RECOMENDACIONES	46
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
11. ANEXOS	55
11.1 Anexo I	55
11.1.1 Registro de datos	55
11.1.2 Genotipajes de los pacientes y controles	55
11.2 Anexo II	68
11.2.1 Datos clínicos de los pacientes de la PUCRS	68
11.2.2 Datos clínicos de los pacientes del HCPA	72
11.3 Anexo III	75
11.3.1 Patrón de bandas por BI-PASA para el polimorfismo T1237C	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotografía de biopsias de ambos tipos de enfermedad inflamatoria intestinal (Enfermedad de Crohn y Colitis ulcerativa).	4
Figura 2. Cascada de señalización de los TLRs exógenos y endógenos.	11
Figura 3. Triada de factores ambientales, genéticos y del sistema inmune del hospedero en la mucosa intestinal.	12
Figura 4. Esquematización de la base genética de la EII y el TLR9.	14
Figura 5. Posición de los polimorfismos G2848A y T-1237C en el cromosoma 3p21.3.	15
Figura 6. Genotipificación por PCR-RFLP de los pacientes con EII para el polimorfismo G2848A del gen <i>TLR9</i> .	27
Figura 7. Genotipificación por BI-PASA de los pacientes con EII para el polimorfismo T-1237C del gen <i>TLR9</i> .	28

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Polimorfismos en el gen <i>TLR9</i> analizados en el presente estudio.	16
Tabla 2. Iniciadores para la genotipificación de los polimorfismos en estudio.	22
Tabla 3. Concentración final de los reactivos para la amplificación del polimorfismo G2848A.	22
Tabla 4. Condiciones para la obtención de los fragmentos de restricción	23
Tabla 5. Concentración final de los reactivos para la amplificación del polimorfismo T-1237	24
Tabla 6. Registro de datos de los genotipos para ambos polimorfismos.	25
Tabla 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo G2848A en el grupo 1.	29
Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo G2848A en el grupo 2.	29
Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo G2848A en el grupo 3.	30
Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el <u>GRUPO 1</u> , en la población con EII y controles	31
Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el <u>GRUPO 1</u> , por subtipo de enfermedad – controles y EC - CU.	32
Tabla 12. Análisis de residuos ajustados de los genotipos para el polimorfismo G2848A en el <u>GRUPO 1</u> , en la población con EII y controles.	32

Tabla 13. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el <u>GRUPO 1</u> , en la población con subtipo de enfermedad (EC y CU) y controles.	33
Tabla 14. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el <u>GRUPO 2</u> , en la población con EII y controles.	34
Tabla 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el <u>GRUPO 2</u> , por subtipo de enfermedad y controles.	34
Tabla 16. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el <u>GRUPO 3</u> , en la población con EII y controles.	35
Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el <u>GRUPO 3</u> , por subtipo de enfermedad - controles y EC - CU.	36
Tabla 18. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el <u>GRUPO 3</u> , en la población con EII y controles.	37
Tabla 19. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el <u>GRUPO 3</u> , en la población con EC y controles.	37
Tabla 20. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen <i>TLR9</i> en la población con EII vs. Controles, para cada uno de los casos.	38
Tabla 21. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen <i>TLR9</i> en la población con EC vs. Controles, para cada uno de los casos.	38
Tabla 22. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen <i>TLR9</i> en la población con Cu vs. Controles, para cada uno de los casos.	38

RESUMEN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se divide en la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), las cuales corresponden a una serie de patologías inflamatorias de etiología multifactorial que afectan principalmente el tracto intestinal. En los últimos años, la incidencia de estas enfermedades ha aumentado en Brasil y en poblaciones occidentales. Los genes de la familia de los Toll-like receptors (TLRs) tienen un papel importante en la regulación intestinal, principalmente en la señalización pro-inflamatoria en respuesta a distintos ligandos bacterianos y en la estimulación de diversas respuestas inflamatorias que causan una inflamación intestinal aguda y crónica. Algunos estudios consideraron al gen *TLR9* (receptor que reconoce el ADN) y han encontrado que ciertos polimorfismos están asociados a esta enfermedad. Por ello, este gen es considerado como candidato para susceptibilidad en el desarrollo de la EII. Debido a que en Brasil todavía no ha sido estudiada la relación de estos polimorfismos con las EII, el objetivo del presente estudio fue analizar la frecuencia de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen *TLR9* en pacientes con EII (descendientes de europeos) provenientes de 2 centros hospitalarios del sur de Brasil y su comparación con individuos sanos como grupo control. Para el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas se dividió a las poblaciones en 3 grupos: grupo 1, pacientes provenientes del hospital de la Pontificia Universidad Católica de Río Grande del Sur, grupo 2, pacientes provenientes del Hospital de Clínicas de Porto Alegre, y el grupo 3, pacientes provenientes de ambos centros hospitalarios. Nuestro estudio encontró un papel significativo del genotipo heterocigoto en pacientes con EII para el polimorfismo G2848A al analizarlo en el grupo 1 - control ($P = 0.000002$) y en el grupo 3 - control ($P = 0.00057$). Asimismo, se encontraron valores significativos de este polimorfismo cuando se subdividió a la población en EC y CU. Por otra parte, el polimorfismo T-1237C no tiene un valor significativo en los grupos analizados. Los resultados obtenidos muestra que el genotipo heterocigoto G/A de la variante alélica 2848A se presenta como un factor de susceptibilidad en la enfermedad inflamatoria intestinal en la población evaluada.

Palabras claves: EII, gen *TLR9*, polimorfismos, susceptibilidad, asociación

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is divided in ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), which correspond to a number of inflammatory diseases of multifactorial etiology primarily affect the gastrointestinal tract. In recent years incidence of these diseases has been increased in Brazil and in Western populations. The genes of the Toll-like receptors (TLRs) family have an important role in intestinal regulation, mainly in pro-inflammatory signaling in response to different bacterial ligands and stimulation of inflammatory responses which cause acute and chronic intestinal inflammation. Some studies have considered the *TLR9* gene (receptor that recognizes the DNA) and found that some polymorphisms have been associated with this disease. For this reason, is considered as a candidate gene for susceptibility in the development of IBD. Because in Brazil has not yet been studied the relationship of these polymorphisms with IBD, the objective of this study was to analyze the frequency of polymorphisms G2848A and T-1237C from *TLR9* gene in patients with IBD (European descent) from 2 Southern Brazil hospital centers and compared with healthy individuals which represented the control group. To the analyze of allelic frequencies, the populations were divided in 3 groups: group 1, patients from Pontificia Universidad Catolica de Rio Grande del Sur Hospital, group 2, patients from the Clinicas de Porto alegre Hospital, and group 3, patients from both hospitals. Our study found a role significant from heterozygote genotype for the polymorphism G2848A when it was tested in the group 1 - control ($P = 0.000002$) and for the group 3 - control ($P = 0.00057$). Also, were found significant values for this polymorphism when the population was subdivided in UC and CD. Otherwise, the polymorphism T-1237C hasn't a significant value in the groups analyzed. The results obtained show that the heterozygote genotype G/A of the 2848A allelic variant is presented as a susceptibility factor in inflammatory bowel diseases in the population evaluated.

Key words: IBD, *TLR9* gene, polymorphisms, susceptibility, association

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y crónica que afecta el intestino, y comprende a la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU) (Strober *et al.*, 2007). En los últimos años se ha tomado mucha importancia al estudio de la fisiopatología e inmunogenética de la EII debido a que su etiología aún permanece desconocida (Ferguson *et al.*, 2007).

Un determinante crítico para el desarrollo de la EII en individuos genéticamente susceptibles es la perturbación de la homeostasia entre las bacterias comensales y la inmunidad de la mucosa intestinal (Xavier y Podolsky, 2007). Esta homeostasia es consecuencia de un riguroso proceso de discriminación rápida y precisa entre “lo propio” y “no propio” ejercida por las células del sistema inmune innato. Este proceso se basa en el inicio de una cascada de señalización por patrones moleculares ampliamente conservados denominados receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), como los receptores tipo-toll (TLRs) (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

Muchos estudios reportan que los TLRs son los responsables de la defensa innata del intestino y tienen como finalidad el mantenimiento de la mucosa y la homeostasis comensal. Existen factores ambientales, genéticos e inmunológicos que forman una red regulatoria multidimensional y altamente interactiva en la que los TLRs tienen como función ejercer un control en la mucosa intestinal. Un desbalance dentro de esta red puede promover una señalización aberrante de los TLRs, contribuyendo críticamente a un proceso de inflamación crónica en la EII. Tal desbalance está fuertemente ligado a la responsabilidad de estos receptores pero podría implicar principalmente al TLR9, el cual

reconoce el ADN propio y extraño, como por ejemplo de la flora intestinal (ADN_{fl}) y de patógenos (Cario, 2005; Hall *et al.*, 2008; Cario, 2010).

Trabajos previos han realizado estudios caso-control de los polimorfismos T-1237C y G2848A del gen *TLR9* en pacientes con EII. En una población alemana, se reportó que la frecuencia del alelo -1237C estuvo incrementada significativamente en pacientes con la EC al compararlos con un grupo control de individuos sanos (Torok *et al.*, 2004). Por otro lado, Hong *et al.* (2007) no encontraron diferencia significativa en la frecuencia del alelo -1237C en pacientes con la EC al ser comparado con el grupo control representado por individuos sanos, pero cuando realizaron estudios de meta-análisis encontraron que este alelo polimórfico si estuvo asociado con la EC.

En Brasil, un estudio previo reporta un aumento de la frecuencia de la EII con 257 nuevos casos (126 con EC y 131 con UC) diagnosticados en el Hospital de Clínicas (HC) de la Facultad de Medicina de Riberão Preto de la Universidad de São Paulo (FMRP-USP) entre 1980-1999 (Souza *et al.*, 2002). Asimismo, se han diagnosticado 65 nuevos casos en el Hospital Prof. Edgar Santos de la Universidad de Bahía durante el periodo de marzo a diciembre del 2006 (Oliveira *et al.*, 2006). Debido a que se ha observado una incidencia de casos de esta enfermedad en el Brasil, grupos de investigación de este país han tomado mucha atención al estudio de la EII desde el punto de vista de la inmunogenética ya que hasta la fecha no existen reportes de este tipo de estudio en poblaciones brasileiras.

Por este motivo, el presente trabajo tiene como objetivo principal determinar la frecuencia de los polimorfismos a nivel de nucleótido G2848A y T-1237C del gen *TLR9* y comparar estas frecuencias en una población con EII del sur de Brasil con un grupo control.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características de la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y crónica que afecta el intestino. Esta enfermedad comprende a la enfermedad de Crohn (EC) y a la Colitis Ulcerativa (CU), las cuales tienen muchas semejanzas, siendo la principal diferencia la zona de afectación. La EII ha sido un enigma para los gastroenterólogos e inmunólogos desde su primera descripción, hace unos 75-100 años atrás, debido a que es resultado de la interacción de múltiples factores (Strober *et al.*, 2007).

2.1.1 La enfermedad de Crohn (EC)

La enfermedad de Crohn es una grave enfermedad que actúa en cualquier parte del tracto gastrointestinal con ulceración discontinua, afectando principalmente el íleon (intestino delgado) y el colon (intestino grueso), y una presencia frecuente de granulomas (figura 1). Sus síntomas gastrointestinales son heterogéneos, pero típicamente incluyen dolor abdominal, diarrea y sangrado rectal, así como también síntomas sistémicos que incluyen pérdida de peso, fiebre y fatiga. La EC puede causar obstrucción intestinal debido a fístulas y abscesos (Strober *et al.*, 2007).

2.1.2 La colitis ulcerativa (CU)

La colitis ulcerativa se caracteriza por la inflamación y ulceración de la capa más superficial del colon. Los síntomas son parecidos a la EC pero no se presenta el desarrollo de fistulas. Es llamada colitis distal o limitada cuando actúa apenas al lado izquierdo del colon y cuando ha cubierto todo el colon es denominada pancolitis. Los análisis histopatológicos incluyen la presencia de un número significativo de neutrófilos

dentro de la lámina propia y las criptas donde estos se encuentran formando micro-absesos (Xavier y Podolsky, 2007) (figura 1). Cerca del 50% de los pacientes con CU sufren recaída durante un año, y del 20 al 30% de los pacientes con pancolitis se les practica la colectomía (Carter *et al.*, 2004).

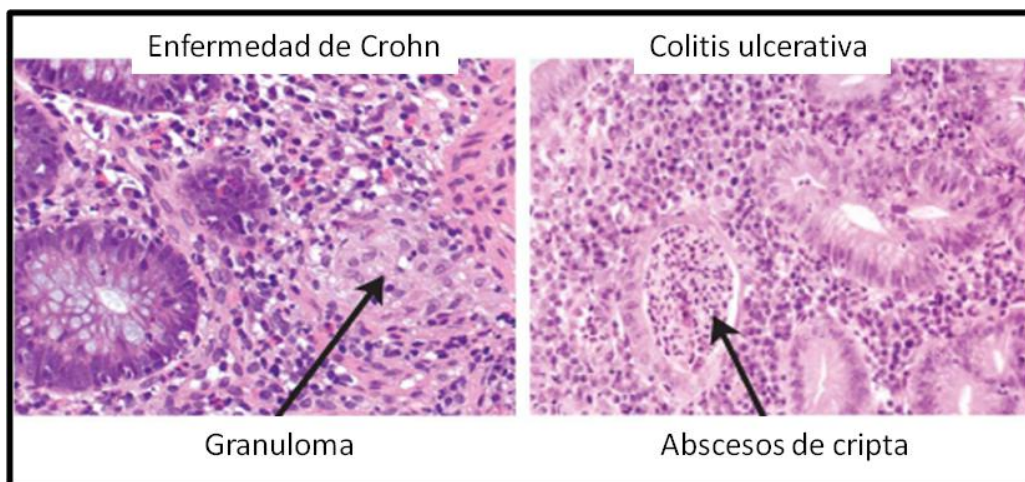


Figura 1. Biopsias de ambos tipo de EII. Izquierda: EC, granuloma compuesto de macrófagos compactos, células gigantes y células epitelioides. Derecha: CU, Abscesos de cripta formado por neutrófilos. Imagen de Xavier y Podolsky (2007).

Ambos tipos de enfermedad están asociados con riesgo al desarrollo de carcinoma de colon. La cirugía no permite la cura, solo se utiliza para disminuir el impacto de la enfermedad: el 50% de los pacientes necesitan cirugía en los primeros 10 años de la enfermedad y aproximadamente el 80% necesitan de cirugía posteriormente (Asociación Brasileira de Colitis Ulcerativa y Enfermedad de Crohn, 2007; Ferguson *et al.*, 2007).

2.1.3 Manifestaciones no intestinales

La EC y la CU son desordenes sistémicos que involucran frecuentemente otros órganos, caracterizando los síntomas no intestinales. Prácticamente, cualquier parte del cuerpo puede ser afectada por el proceso inflamatorio, pero los órganos frecuentemente más afectados incluyen la piel, los ojos, las articulaciones, el intervalo biliar y los

pulmones. Algunos síntomas, tales como la pérdida de peso, fiebre, fatiga, lesiones orales, desarrollo de piedras biliares, pancreatitis, nefrolitiasis y amiloidosis están más asociados con la EC que con la CU. Otros síntomas, como gangrena en la piel, son vistos por igual en la EC y CU. Manifestaciones extra intestinales más raras pueden incluir eventos tromboembólicos, osteopenia y osteoporosis, afectando al pulmón y al sistema nervioso central (Rothfuss *et al.*, 2006; Strober *et al.*, 2007).

2.2 Epidemiología

La tasa de incidencia de la CU varía entre 0.5 y 24.5/10⁵ habitantes, mientras que de la EC varía entre 0.1 y 16/10⁵ habitantes en el mundo, con una tasa de prevalencia de EII que alcanza hasta 396/10⁵ habitantes. La tasa de incidencia más alta ha sido reportada al norte y este de Europa, así como también en Norteamérica (Lakatos, 2006). Otro estudio reporta un incremento de la prevalencia en Asia, China, siendo 11.6/10⁵ para CU y 1.4/10⁵ para EC durante los últimos 20 años (Wang *et al.*, 2010).

La incidencia de estas enfermedades parece estar presentando un cuadro de crecimiento, y esto ha sido reflejado en los índices de incidencia y prevalencia de EII en la provincia de Veszprem (Hungría), los cuales aumentaron y llegaron a ser equivalentes a los países de la Europa Occidental (Lakatos *et al.*, 2004). Por otro lado, se estima que la EII afecta a 2 millones de individuos en los Estados Unidos (Asociación Brasileira de Colitis Ulcerativa y Enfermedad de Crohn, 2007) y actúa aproximadamente sobre el 0.5% de la población de Canadá, país con mayor incidencia y prevalencia de EC (Bernstein *et al.*, 2006). Los datos epidemiológicos relacionados a la EII en América Latina sugieren que existen a una baja incidencia de 0.03/10⁵ personas por año (Linares de la Cal *et al.*, 1999). En Chile se han reportado 57 casos (Figuerola *et al.*, 2005) y en Uruguay se han registrado 88 pacientes por un periodo de 52 años (Lade *et al.*, 2005). A excepción del Brasil, un estudio sugiere un aumento de la frecuencia de ésta enfermedad con 257

nuevos casos (126 con EC y 131 con UC) diagnosticados en el Hospital de Clínicas (HC) de la Facultad de Medicina de Riber o Preto de la Universidad de São Paulo (FMRP-USP) entre 1980-1999 (Souza *et al.*, 2002). Asimismo, Oliveira *et al.* (2006) reportaron 65 casos con EC: 21 casos en pacientes blancos y 44 casos en población no blanca (entre mestizos y afroamericanos) diagnosticados en el Hospital Universitario Prof. Edgar Santos de la Universidad Federal de Bahía durante el periodo de marzo a diciembre del 2006. Aunque este estudio sugiere que el bajo número de pacientes estudiados pudo haber afectado la significancia de incidencia de la enfermedad en la población blanca. Estos reportes nos demuestran que existe una heterogeneidad de la enfermedad en los diferentes grupos étnicos del mundo y que datos actuales epidemiológicos de diferentes países son relevantes para comprender mejor el progreso de esta enfermedad.

En el Perú, se diagnosticaron 17 casos de la EC en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins (EsSALUD) en los últimos 20 años. Debido a su muy baja incidencia, son escasos los trabajos sobre la EC, por lo que se desconoce su patrón clínico y evolutivo en nuestro medio (Benda o y Frisancho, 2010). Por otro lado, con respecto a la CU, la incidencia fue de 2,1 casos por año, siendo el promedio de edad al momento del diagnóstico de 45 años y el género predominante femenino (62.8%). (Calderón *et al.*, 2004).

Un análisis de la BSGRU (British Society of Gastroenterology Research Unit) document  la incidencia de EII en infantes, con una frecuencia de 5.2 por 100 000 niños (menores de 16 años de edad) por año en esta población británica (Ravikumara y Sandhu, 2006). Como la EII actúa también en niños y adolescentes, un grupo de investigadores de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, estandarizó el criterio de diagnóstico en estas poblaciones con EII y se obtuvieron recomendaciones las cuales han sido denominadas: "The Porto Criteria" (*Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis,*

the Porto criteria (IBD working group of the European Society for paediatric gastroenterology, hematology and nutrition, 2005).

2.3 Factores inmunológicos

El sistema inmune está íntimamente involucrado en la fisiopatología de la enfermedad. Se cree que la principal diferencia entre individuos sanos y portadores de EII está en el hecho de que los primeros tienen la habilidad de regular el estado inflamatorio y retornar a la condición normal después del desarrollo de una respuesta inmune determinada, mientras que individuos susceptibles a la enfermedad entran a un estado de inflamación crónica descontrolada, siendo incapaces de regular la inflamación causada por el patógeno (Sands, 2007).

Diversos trabajos han intentado asociar la diversidad de la flora intestinal de los pacientes y su participación al desarrollo de EII (O'Hara *et al.*, 2006), mientras que otros se han dispuesto a caracterizar más detalladamente la existencia de una respuesta inmune específica direccionada a esta flora intestinal (Dubinsky *et al.*, 2006). Éstas anormalidades inmunes desempeñan un papel fundamental en la iniciación y perpetuación tanto de la enfermedad de Crohn como de la colitis ulcerativa (Dignass *et al.*, 2004).

Se sabe también que las citoquinas, mediadores solubles del sistema inmune, están involucradas en la morbilidad asociada a la EII (Mizoguchi *et al.*, 2002). Un análisis de la mucosa intestinal inflamada de individuos portadores de EC ha demostrado un aumento en la expresión de ciertas citoquinas pro-inflamatorias, tales como la interleuquina 2 (IL-2), la interleuquina 12 (IL-12), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ), lo que sugiere un direccionamiento del sistema inmune del individuo a un patrón de respuesta T auxiliar tipo 1 (Th1). En contraste, en portadores de

CU se encontró una respuesta T auxiliar tipo 2 (Th2), que está asociada con la inmunidad humoral y con el perfil que comprende la expresión de IL-4, IL-5, IL-6 y IL-13. Estos estudios sugieren que, a pesar de que pertenecen a un mismo grupo de enfermedad inflamatoria intestinal, la EC y la CU presentan características particulares e inducen respuestas inmunes distintas (Dignass *et al.*, 2004; Sands, 2007; Xavier y Podolsky, 2007).

2.4 Genes de susceptibilidad

Aproximadamente el 20% de las personas con alguna forma de EII tienen algún familiar con EII (pero no necesariamente afectado por la misma forma de enfermedad inflamatoria). Estudios con gemelos sugieren una fuerte base genética, en el cual 36% de gemelos monocigóticos compartieron la enfermedad, en comparación de los gemelos dicigóticos, que fue apenas el 4% (Ferguson *et al.*, 2007). Por lo tanto, la EII es una enfermedad que presenta factores genéticos de susceptibilidad.

El primer gen identificado con asociación a la EII fue el *CARD15/NOD2* (*caspase recruitment domain family*), el cual está localizado en la posición 16q12 y codifica a la proteína nod2 (*nuclear type binding oligomerization domain 2*). Este es un gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn y se observó asociaciones genotipo-fenotipo en el intestino delgado con un comportamiento más agresivo de la enfermedad (Van Limbergen *et al.*, 2007). Este descubrimiento demostró la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de la EC y permitió proponer el concepto de que esta enfermedad es genéticamente heterogénea (Papp *et al.*, 2006).

El gen *CARD15/NOD2* está ubicado en la región denominada IBD1, la cual fue definida conjuntamente con la región IBD5, y otras, a través de estudios de ligamiento en donde se asociaron marcadores genéticos ligados fuertemente al desarrollo de la EII. De

esta manera, los genes próximos a estas regiones son considerados como genes candidatos para susceptibilidad a la EII (Van Limbergen *et al.*, 2007).

Después creció el interés en el estudio de genes reguladores de la respuesta inmune innata. Las variantes de los genes *MUC* (mucinas), *NODLRR* (NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*, LLR: *leucine rich region*) y *TLR* (*Toll-like receptor*) han sido asociadas con EII en diferentes poblaciones (Van Limbergen *et al.*, 2007). Estos investigadores indican que los riesgos relativos asociados a estas variantes son probablemente pequeños, siendo necesario el desarrollo de grandes estudios de caso-control.

Recientemente se ha descrito la asociación entre el gen *IL23R* (*interleukin-23 receptor*) y la susceptibilidad a la EII. Este gen está localizado en la región 1p31 y codifica la variante rs11209026 (1142>A), la cual está asociada con una fuerte protección contra la enfermedad de Crohn (Glas *et al.*, 2007). Las variantes de los genes *OCTN1* (1672 C>T, *organic cation transporter cluster*) y *OCTN2* (-207 G>C), también conocidos como *SLC22A4* (*solute carrier family 22, number 4*) y *SLC22A5*, respectivamente, están localizados en la región IBD5, y están relacionadas a la enfermedad de Crohn. Por otro lado, una variante del gen *ABCB1* (*ATP-binding cassette subfamily B member 1*) estaría asociada a un riesgo aumentado de colitis ulcerativa (Ferguson *et al.*, 2007).

Otros genes candidatos involucrados con la EII incluyen: *DLG5* (*Drosophila discs large homologue 5*), *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*), *PHOX2B* (*paired-like homeobox 2B*), *NCF4* (*neutrophil cytosolic factor 4*), *FAM92B* (*family with sequence similarity 92, member B*) y *PTGER4* (*prostaglandin E receptor 4 – subtype EP4*) (Noble *et al.*, 2006; Ardizzone *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2007; Glas *et al.*, 2007; Libioulle *et al.*, 2007).

2.5 Receptores de tipo Toll (TLRs)

Los TLRs son conservados desde *Caenorhabditis elegans* hasta mamíferos (Janeway y Medzhitov, 2002; Akira y Takeda, 2004; Beutler *et al.*, 2006). Toll, el miembro fundador de la familia TLR, fue inicialmente identificado como un producto esencial para el desarrollo de la polaridad dorsoventral embrionaria en *Drosophila*. Más tarde, se demostró su papel crítico en la respuesta a hongos en moscas (Lemaitre *et al.*, 1996). Los TLRs son receptores glicoproteicos integrales de membrana del tipo I, caracterizados por poseer un dominio extracelular que contiene motivos repetidos ricos en leucina (LRR) y un dominio de señalización citoplasmática homólogo al del receptor de interleuquina de tipo I (IL-1R) denominado dominio de homología Toll/IL-1R (TIR) (Bowie y O'Neill, 2000).

El motivo LRR está compuesto de 19-25 repeticiones en tándem y cada repetición tiene de 24-29 aminoácidos de longitud conteniendo residuos XLXXLXLXX así como otros aminoácidos conservados (XØXXØXXXXFXXLX; Ø = residuo hidrofóbico) (Bell *et al.*, 2003). La estructura del LRR consiste de una hoja beta plegada y una alfa hélice conectadas por alzas, y se postula que esta estructura con superficie cóncava está involucrada directamente con el reconocimiento de varios patógenos (Akira y Takeda, 2004). Estos receptores pueden ser divididos en varias subfamilias y cada una reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La subfamilia del TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lípidos, mientras que los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos (Beutler *et al.*, 2006).

Los TLRs son expresados extra o intracelularmente: los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 son expresados en la superficie, y los TLRs 3, 7, 8 y 9 son encontrados casi exclusivamente en compartimientos intracelulares tales como endosomas. Los ligandos de estos últimos, principalmente ácidos nucleicos, requieren una internalización en el endosoma antes que la señalización sea gatillada (Beutler *et al.*, 2006).

La estimulación de células con ligandos de TLRs causa el reclutamiento de proteínas adaptadoras, como el MyD88, a la porción citoplasmática del receptor a través de interacciones homofílicas de los dominios TIR. Esto conlleva a una cascada de señalización y producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, así también como quimiocinas del intestino (Beutler *et al.*, 2006) (figura 2).

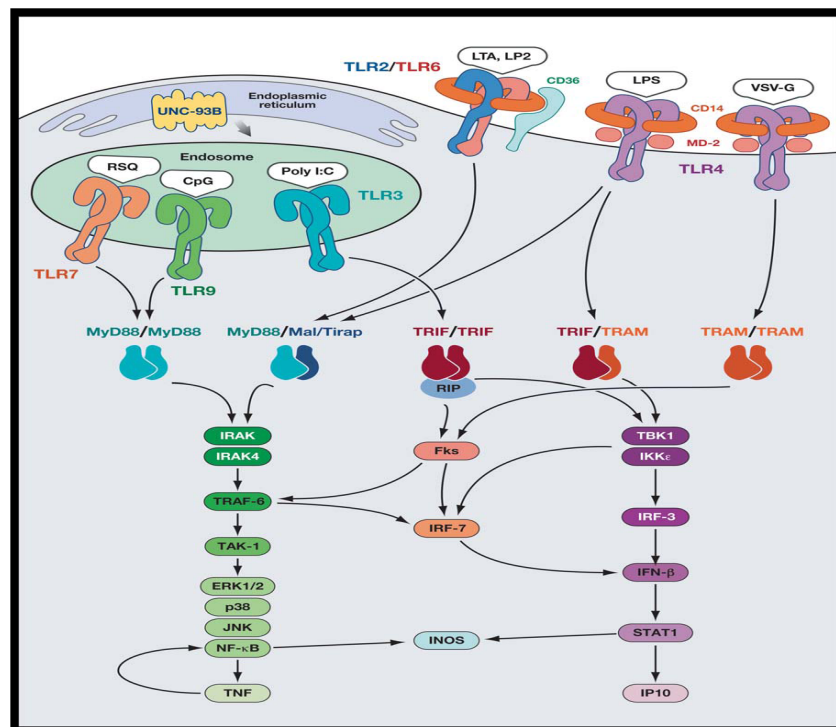


Figura 2. Cascada de señalización de los TLRs exógenos y endógenos (Beutler *et al.*, 2006).

2.6 TLRs en el desarrollo de la EII

Como ya se ha mencionado en el punto anterior, los receptores del tipo Toll son una clase de PRRs transmembranal que tienen un rol clave en la inducción de genes pro- y anti-inflamatorios, y en el control de la respuesta inmune adaptativa (Poltorack *et al.*, 2000). Muchos estudios han reportado que los TLRs del sistema inmune innato son los mediadores claves en la defensa innata del intestino, encargándose de mantener la mucosa y la homeostasis comensal (Rakkoff-Nahom *et al.*, 2004, Cario, 2005; Lee *et al.*,

2006;). Resultados recientes en modelos murinos con colitis han ayudado a revelar la importancia del mecanismo de la disfunción del TLR en la patogénesis de la EII, siendo evidente que los factores ambientales, genéticos y del sistema inmune forman una triada regulatoria multidimensional y altamente interactiva en la que los TLRs ejercen un control en la mucosa intestinal (Cario, 2010). Un desbalance dentro de esta red puede promover una señalización aberrante de estos receptores, contribuyendo críticamente a un proceso de inflamación crónica en la EII. Múltiples factores pueden regular positivamente o negativamente la señalización del TLR (Cario, 2010) (figura 3).

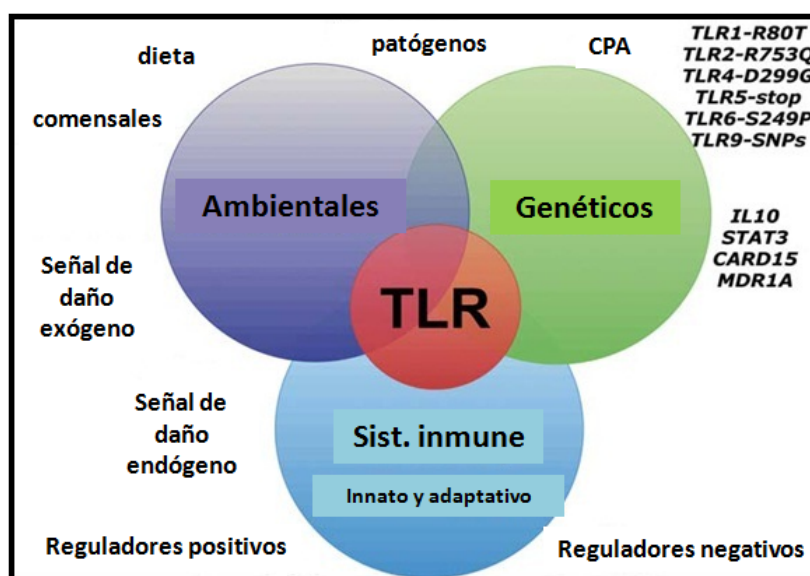


Figura 3. Factores ambientales, genéticos y el sistema inmune del hospedero, forman una triada de regulación altamente interactiva y multidimensional que controla la función del TLR en la mucosa intestinal (Cario, 2010).

Los TLRs son expresados constitutivamente e induciblemente a través de todo el tracto gastrointestinal por una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo los 4 principales linajes celulares del epitelio intestinal (enterocitos absortivos, células Paneth, células caliciformes y enteroendocrinas), miofibroblastos, células dendríticas (DCs), células T CD4+ y monocitos/macrófagos que fagocitan patógenos (Cario, 2005).

En el intestino sano, estos receptores están presentes solo en pequeñas cantidades y los reguladores negativos mantienen el estado basal de activación y previene una señalización prolongada y excesiva de los TLRs. Esta homeostasia es consecuencia de un riguroso proceso de discriminación rápida y precisa entre “lo propio” y “no propio” ejercida por las células del sistema inmune innato. Ese proceso está basado en el reconocimiento de PAMPs conservados, los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) como los TLRs (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

En el intestino con EII, diferentes TLRs están significativamente sobre-expresados en ciertos subtipos celulares de la mucosa intestinal y los reguladores positivos inician un estado aberrante de activación y permiten una señalización de TLRs descontrolada. El desbalance de esta interrelación entre comensales y PRRs origina el daño del tejido y una posterior inflamación de la mucosa intestinal. La señalización aberrante de estos PRRs puede estimular una diversa respuesta inflamatoria conllevando a una inflamación intestinal crónica con diferentes fenotipos clínicos. De acuerdo a esto, queda claro que el señalamiento de los TLRs en el compartimiento del epitelio intestinal esta crucialmente involucrada en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la reparación de tejidos (Cario, 2005).

2.6.1 Base genética de la EII y el TLR9

El TLR9 reconoce dinucleótidos CpG no metilados, los cuales son abundantes en el ADN de procariotas encontrados en la flora intestinal (Beutler *et al.*, 2006). Así, un grupo de investigadores, encontraron que el ADN de la flora intestinal (ADN_{fi}) juega un rol importante en esta homeostasis intestinal a través del gatillamiento del TLR9 (Hall *et al.*, 2008).

Se encontró que existe un desequilibrio de las células T reguladoras y T efectoras (Treg/Teff) en murinos TLR9^{-/-} el cual conlleva a una discapacidad de la respuesta inmune ante una infección oral y a una vacunación oral, tal respuesta inmune fue recuperada en murinos tratados con antibióticos y siguiendo una reconstitución de ADN_{fi}, el cual produjo una neutralización de las células Treg. Este trabajo demostró que el ADN_{fi} actúa como un adjuvante inmunológico natural y críticamente controla el balance entre la frecuencia y función de células Treg y Teff (Hall *et al.*, 2008) (figura 4).

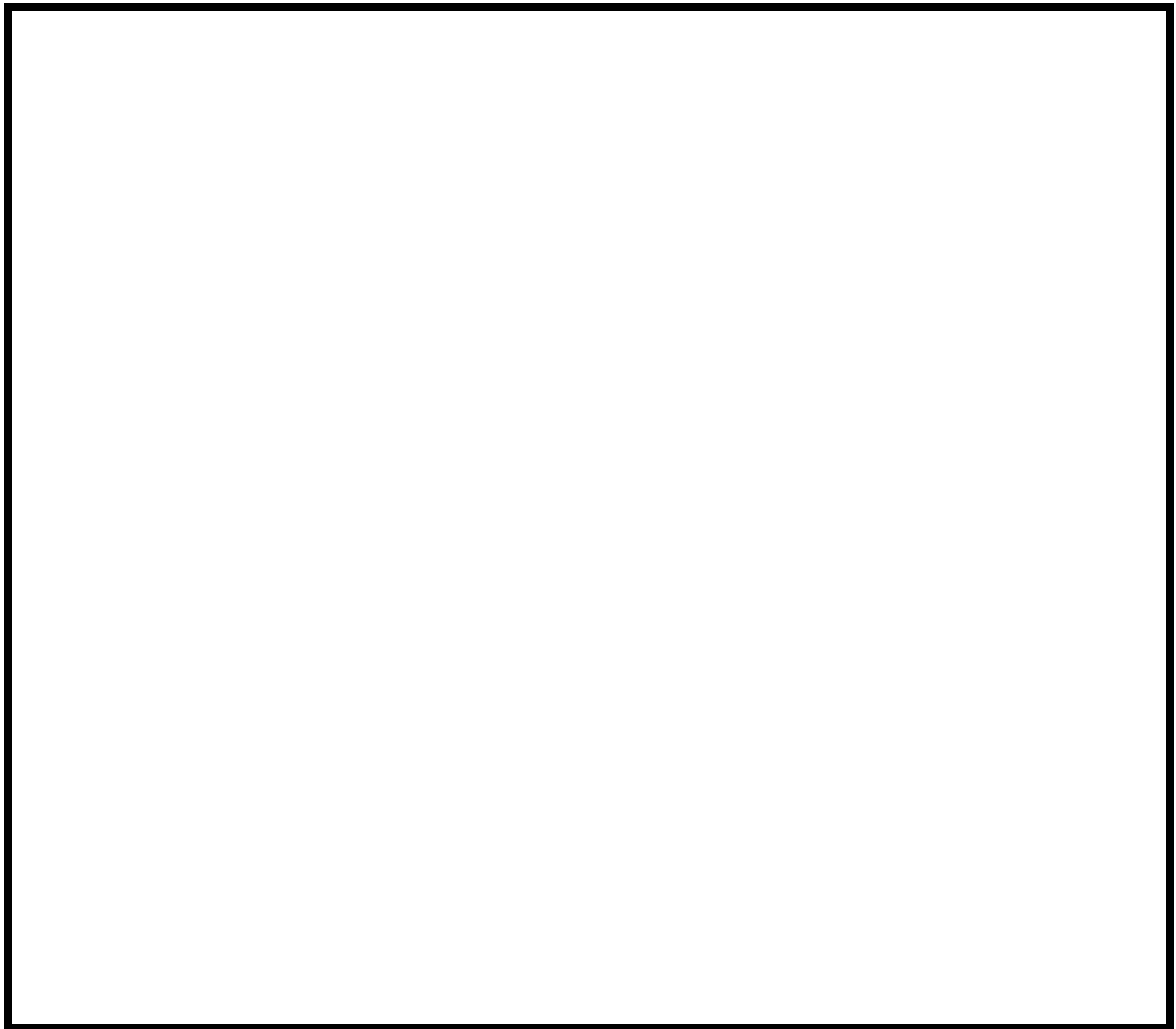


Figura 4. Esquematzación de la base genética de la EII y el TLR9.

Wu *et al.*, (2006) demostraron que la presencia de CpG en el tiempo de infección de *Leishmania* puede limitar la acumulación de células Treg en la dermis infectada. Así también, previos trabajos han identificado una asociación entre la EC y el polimorfismo del promotor en el gen *TLR9* de humanos (Torok *et al.*, 2004), tal asociación soporta la idea de un importante rol de la sensibilidad del ADN_{fi} en la fisiopatología de la EII. Sin embargo, la interacción del hospedero entre los ligandos expresados por el ADN_{fi} y el TLR9, los cuales pueden influenciar sobre el regulamiento de las células Treg y la subsecuentemente respuesta inmune local en el intestino es aún desconocida (Hall *et al.*, 2008).

2.7 El Gen *TLR9*

El gen *TLR9* está localizado en el cromosoma 3 (Hur *et al.*, 2005) y tiene solo 2 exones, siendo el segundo exón el que contiene la mayor porción codificante (Poltorack *et al.*, 2000) (figura 5). Se han reportado SNPs en este gen, los cuales han sido tema de estudio para su asociación con enfermedades del sistema inmune (Lazarus *et al.*, 2003; Torok *et al.*, 2004; Hur *et al.*, 2005; Honget *et al.*, 2007; Peixoto-Rangel *et al.*, 2009; Torok *et al.*, 2009).

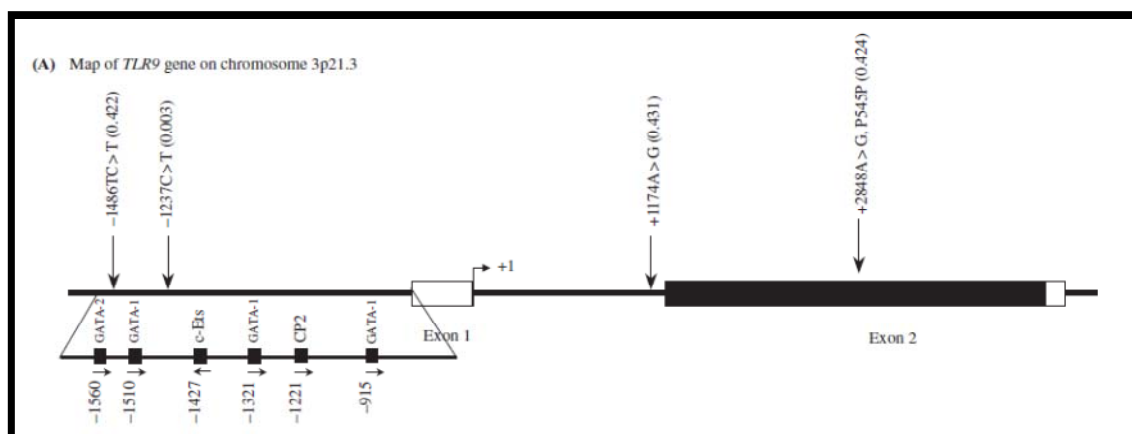


Figura 5. Posición de los polimorfismos G2848A y T-1237C en el cromosoma 3p21.3 (Hur *et al.* 2005).

La proteína TLR9 de humano contiene 1 032 aminoácidos y tiene una identidad del 75,5% con el TLR9 de *Mus musculus*. El TLR9, así como las otras proteínas del tipo TLR, contiene repeticiones extracelulares ricas en leucinas (LRRs) y un dominio toll/interleuquina-1R citoplásmico. Además, tiene un péptido señal de 1-25 residuos y un dominio transmembrana de 819-836 residuos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/605474>).

Existen dos polimorfismos de este gen que se han reportado en los últimos años: rs5743836 (T-1237C) y rs352140 (G2848A) (tabla 1). Hasta el momento, no hay estudios que correlacionen ambos polimorfismos con sus consecuencias funcionales. El polimorfismo G2848A (la cual es una substitución sinónima) y el T-1237C (localizada en la región promotora del TLR9) tienen cuatro haplotipos presentes comúnmente en la población americana-europea (Lazarus *et al.*, 2003).

Tabla 1. Polimorfismos en el gen *TLR9* analizados en el presente estudio.

POLIMORFISMO*	POSICION ABSOLUTA	NCBI SNP CLUSTER ID	SECUENCIA 5'-3'
G2848A	chr3: 52112673	rs352140	TACC [G/A] AGAT
T-1237C	chr3: 52116758	rs5743836	GTTT [T/C] CAGG

* Inicio de transcripción desplazamiento relativo al codón de inicio de transcripción.

Diferentes estudios reportan que estos polimorfismos están asociados a varias enfermedades como alergia (Noguchi *et al.*, 2004; Berghofer *et al.*, 2005), susceptibilidad a infecciones (Carvalho *et al.*, 2007), asma (Lazarus *et al.*, 2003; Noguchi *et al.*, 2004; Lachheb *et al.*, 2008; Smit *et al.*, 2009), arteriosclerosis (Hamann *et al.*, 2006), lupus eritematoso (Hur *et al.*, 2005) y la enfermedad de Cronh (Torok *et al.*, 2004). Recientemente, el polimorfismo G2848A ha sido asociado a la retinocoroiditis toxoplásmica en Brasil (Peixoto-Ranguel *et al.*, 2009).

2.7.1 Polimorfismos del gen *TLR9* en la EII

Se han realizado estudios caso-control de asociación de los polimorfismos -T-1237C y G2848A del gen *TLR9* con la EII. En una población alemana se reportó que la frecuencia del alelo -1237C fue incrementada significativamente en pacientes con EC al compararlos con un grupo control (19.3% vs. 11.9%, $P = 0.0036$) (Torok *et al.*, 2004). Otro estudio no encontró diferencias significativa en la frecuencia de este alelo en pacientes con EC al ser comparado con el grupo control (0.148 vs. 0.154, $P = 0.82$, OR 0.96, 95% IC 0.64 - 1.43), pero si encontraron cuando realizaron estudios de meta-análisis (Hong *et al.*, 2007).

Un reciente estudio ha reportado una fuerte participación del gen *TLR9* con otro locus en la EII. El polimorfismo T-1237C mostró una interacción significativa con mutaciones del gen *NOD2*, siendo su frecuencia significativamente más alta en pacientes con EC con al menos una mutación en el gen *NOD2* ($P = 0.004$ vs. controles, OR 1.60, 95% IC 1.15 - 2.21). Además, también se observó una interacción gen-gen significativa entre el polimorfismo T-1237C con los polimorfismos rs1004819 del gen *IL23R* ($P = 0.0007$) y 113G/A del gen *DLG5* ($P = 0.0007$) (Torok *et al.*, 2009)

Otros estudios de meta-análisis han confirmado que estos polimorfismos podrían determinar un papel importante en el desarrollo de la EII (Hong *et al.*, 2006). Así también, se ha observado que existen factores de riesgo tales como, historia familiar, el hábito de fumar (asociado más a EC), ocupación y educación profesional, entre otros, en donde se sugiere una fuerte asociación de EII con jóvenes profesionales adultos con un alto nivel de educación (Wang *et al.*, 2010).

3. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

H₁: Existe una asociación entre los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen *TLR9* y la enfermedad inflamatoria intestinal.

Hipótesis alternativa

H₀: No existe una asociación entre los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen *TLR9* y la enfermedad inflamatoria intestinal.

4. OBJETIVOS

General

- Analizar la asociación de los polimorfismos del gen *TLR9* en una población con EII del Sur de Brasil.

Específicos

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos a nivel de nucleótido G2848A y T-1237C del gen *TLR9*.
- Comparar estas frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los grupos de estudio con el control.
- Determinar la frecuencia de los haplotipos en los grupos de estudio comparados con el control.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución de la tesis

El estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunogenética del Departamento de Genética de la Universidad Federal de Rio Grande del Sur (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

5.1 MATERIALES

5.1.1 Pacientes

Se analizó un total de 253 individuos, de los cuales 105 pacientes diagnosticados con EII fueron provenientes del Hospital de San Lucas de la Pontificia Universidad Católica de Rio Grande del Sul (PUCRS) y 148 fueron del Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

De este total de pacientes con EII, se obtuvo una clasificación por subtipo de la enfermedad, de los cuales solo 96 pacientes de la PUCRS fueron diagnosticados, 56 pacientes con EC y 40 con CU, mientras que del HCPA se pudo diagnosticar a los 148 pacientes, siendo 78 con EC y 70 con CU (ver anexo 2).

Se tomó 5mL de muestras de sangre de cada paciente y fueron colectadas después de obtener el libre consentimiento y autorización del Comité de Ética del respectivo hospital de acuerdo con la declaración de Helsinki (Rickham, 1964). El diagnóstico del tipo de enfermedad, edad de inicio de los síntomas y género fueron realizados por el personal de cada centro hospitalario (anexo 1). Estos datos serán utilizados en el futuro para realizar el análisis de asociación de las características clínicas con las frecuencias de los polimorfismos en estudio.

5.1.2 Controles

Un total de 239 individuos sanos fueron donadores de sangre al Hemocentro de Porto Alegre. La gran mayoría de estos individuos tienen su origen en la región urbana de esta ciudad, de la misma manera que los pacientes estudiados. Fueron excluidos del grupo control (a través de entrevista) individuos con enfermedades crónicas o agudas e individuos con historia de enfermedades de origen genético familiar (malformaciones, enfermedades autoinmunes, coagulopatías, entre otras).

Las muestras de ADN de estos individuos están almacenadas en un banco genómico y están listas para su análisis a disposición del laboratorio de Inmunogenética de la UFRGS. Estos voluntarios dieron su consentimiento para participar en estudios que contribuyesen en la comprensión de enfermedades con marcada influencia genética.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Extracción del ADN

Se procedió a la extracción de ADN de cada individuo a partir de la sangre colectada en tubos con EDTA y fueron purificados utilizando la técnica de Salting-out descrita por Lahiri y Nurnberger (1991). Esta técnica consistió en:

- Transferir 5mL de sangre en un tubo centrífuga de 15 mL y agregar 5 mL de buffer baja salinidad que contiene Tris-HCl 10 mM pH 7.6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM y EDTA 2 mM (TKM1).
- Adicionar 125 uL de Nonidet P-40 para el lisado de las células. Mezclar bien por inversión.
- Centrifugar a 2200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar suavemente el sobrenadante y enjuagar el pellet con 5 mL de buffer TKM1, y volver a centrifugar como el paso anterior.

- Resuspender suavemente el pellet en 0.8 mL de buffer con alta salinidad que contiene Tris-HCl 10 mM pH 7.6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, 0.4 M NaCl y EDTA 2 mM (TKM2).
- Adicionar 50 uL de SDS 10%, luego mezclar toda la suspensión pipeteando hasta 4 veces y luego incubar por 10 minutos a 55°C.
- Adicionar 0.30 mL de NaCl 6 M y mezclar bien.
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante que contiene el ADN y eliminar el pellet que contiene el precipitado de proteínas.
- Agregar 2 veces etanol 100% a temperatura ambiental e invertir el tubo varias veces hasta observar el precipitado del ADN.
- Remover el precipitado de ADN y luego ponerlo en un tubo de microcentrífuga que contiene 1 mL de etanol frío al 70%.
- Centrifugar por 5 minutos a 12000 rpm a 4°C.
- Dejar secar el pellet y luego resuspender el ADN en 0.5 mL de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0 a 65°C por 15 minutos.

5.2.2 Genotipificación

Polimorfismo G2848A

La amplificación de la variante rs352140 (G2848A) se realizó con la técnica del PCR-RFLP, utilizándose iniciadores específicos para el segmento génico del alelo polimórfico (Cheng *et al.*, 2007) (tabla 2). Las condiciones del PCR fueron: 35 ciclos de extensión, comprendiendo etapas de denaturación por 45 segundos a 95 °C, alineamiento de los iniciadores por 45 segundos a 55 °C y extensión por 30 segundos a 72 °C, precedidos por una etapa de denaturación por 4 minutos a 94 °C y finalizado por una etapa de extensión de 7 minutos a 72 °C.

Tabla 2. Iniciadores para la genotipificación de los polimorfismos en estudio.

POLIMORFISMO	INICIADORES (5' para 3')
rs352140 (G2848A)	AAGCTGGACCTCTACCACGA
	TTGGCTGTGGATGTTGTT
rs5743836 (T -1237C)	TCATTTCAGCCTTCACTCAGA
	CACATTTCAGCCCCTAGAGGG
	ggcggcggggGTGCTGTTCCCTCTGCCTGA
	gggccgggggATGAGACTTGGGGGAGTTTC

La concentración final de los reactivos utilizados para la amplificación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Concentración final de los reactivos para la amplificación del polimorfismo G2848A.

REACTIVOS	1 RX
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	1 mM
dNTPs	0,2 mM
Iniciador F	0,05 µM
Iniciador R	0,05 µM
Taq polimerasa	0,2 U
DNA genómico	1 µL
Se completo hasta 24 µL con agua libre de nucleasas	

Luego de obtener los fragmentos se utilizó la enzima específica de restricción *Bst*UI (Cheng *et al.*, 2007), la cual reconoce y corta entre la secuencia (subrayado en negritas) 5'...**CGCG**...3'/3'...**GCGC**...5'. La concentración final utilizada para cada muestra fue:

Tabla 4. Condiciones para la obtención de los fragmentos de restricción.

REACTIVOS	1 RX
Buffer 10X	1X
Enzima	0,2 U
Producto de PCR	8 µl
Se completo hasta 15 µL con agua libre de nucleasas	
Incubación 60 °C por toda la noche	

La visualización de los genotipos se realizó en gel de poliacrilamida 6% (24mL H₂O, 8mL acrilamida 30%, 8mL TBE 5X, 26 µL TEMED 14.4 M, 260 µL APS 10%), los cuales fueron teñidos con nitrato de plata y expuesto a luz ultravioleta (figura 6).

Polimorfismo T-1237A

La amplificación de la variante rs5743836 (T-1237C) se utilizó una técnica de PCR denominada Bi-PASA (Amplificación Alelo Específico por PCR Bidireccional) desarrollada por Liu *et al.*, 1997). Esta técnica combina 4 iniciadores: 2 externos y 2 internos de alelo específico en la misma reacción (tabla 2). Esta metodología fue adaptada para el estudio de este polimorfismo en una población portuguesa (Carvalho *et al.*, 2007) (anexo 3) y nuestro grupo se basó en este estudio para estandarizar el BI-PASA en nuestras poblaciones, realizándose curvas de temperaturas de alineamiento y curva de concentración del MgCl₂. Las condiciones obtenidas del PCR fueron: 35 ciclos de

extensión, comprendiendo etapas de denaturación por 15 segundos a 94 °C, alineamiento de los iniciadores por 45 segundos a 60.5 °C y extensión por 45 segundos a 72 °C, precedidos por una etapa de denaturación del ADN y activación de la enzima por 10 minutos a 94 °C y finalizado por una etapa de extensión de 7 minutos a 72 °C.

La concentración final de los reactivos utilizados para la amplificación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Concentración final de los reactivos para la amplificación del polimorfismo T-1237C.

REACTIVOS	1 RX
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	1.5 mM
DNTPs	0.2 mM
Iniciador EP	0.2 µM
Iniciador EQ	0.2 µM
Iniciador IM	0.1 µM
Iniciador IW	0.1 µM
Taq polimerasa	0.2 U
DNA genómico	1 µL
Se completo hasta 24 µL con agua libre de nucleasas	

La visualización de los fragmentos fueron distinguibles en gel de agarosa 2% utilizando gelred y expuesto a luz ultravioleta (figura 7).

5.2.3 Registro de datos

Para facilitar el análisis de haplotipos de acuerdo al formato solicitado por el programa, se procedió a registrar nuestros genotipos de la siguiente manera (ver resultados en el anexo 1):

Tabla 6. Registro de datos de los genotipos para ambos polimorfismos.

POLIMORFISMO T-1237C	POLIMORFISMO G2848A
0 = TT	0 = AA
1 = CT	1 = AG
2 = CC	2 = GG
C = alelo mutante	A = alelo mutante
T = alelo silvestre	G = alelo silvestre

5.2.4 Análisis estadístico

A. Se realizó conteo de los genotipos de ambos polimorfismos para cada individuo (pacientes y controles) y con estos valores se procedió a calcular las frecuencias alélicas y genotípicas observadas utilizando el N de cada población (EII, EC, CU y controles).

$$Frec. genotípica = \frac{\text{Número de un genotipo dado}}{N}$$

$$Frec. alélica = \frac{\text{Número de un alelo dado}}{2N}$$

B. Las frecuencias genotípicas esperadas fueron obtenidas siguiendo el criterio: $AA = 2Np$; $AB = 2Npq$; $BB = 2Nq$, siendo N el número total de individuos de cada población (EII, EC, CU y controles).

C. Con las frecuencias observadas y esperadas, se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos de estudio y controles a través del test del chi-cuadrado.

$$HW = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

C. Estas frecuencias alélicas y genotípicas observadas de los pacientes fueron comparadas con las frecuencias observadas en la muestra control, utilizándose el test exacto de Fisher y el test del chi-cuadrado (X^2), respectivamente, utilizando los programas WinPepi 3.01 versión 3.01 (2000) y SPSS 17.0, a un nivel de significancia menor a 0.05.

D. Se obtuvo las frecuencias de los haplotipos utilizando el programa MLOCUS, este análisis se realizó por cromosoma, siendo N = número de cromosomas, las frecuencias obtenidas de los pacientes fueron comparadas con las del grupo control a través del test de chi-cuadrado (2x4) a un nivel de significancia menor a 0.05.

5.2.5 Clasificación por grupos de estudio

Se procedió a dividir a nuestra población en 3 grupos de estudio:

Grupo 1: Comprende a todos los pacientes provenientes de la PUCRS.

Grupo 2: Comprende a todos los pacientes provenientes de la HCPA.

Grupo 3: Comprende a todos los pacientes provenientes de la PUCRS y del HCPA.

6. RESULTADOS

6.1 GENOTIFICACIÓN

La genotipificación para los homocigotos de alelos polimórficos, homocigotos de alelos silvestres y heterocigotos para cada uno de los polimorfismos de los individuos en estudio (pacientes y controles) fueron registrados como presencia o ausencia de los mismos (figuras 6 y 7) (ver anexo 1).

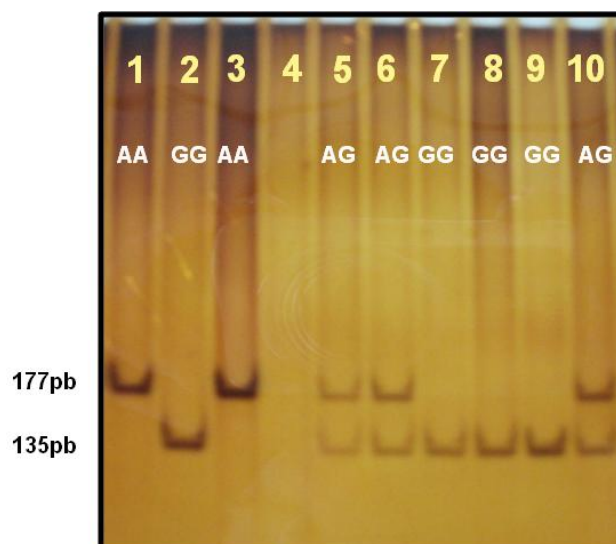


Figura 6. PCR-RFLP: Genotipos de 10 pacientes con EII para el polimorfismo G2848A del gen *TLR9*, en gel de poliacrilamida 6% coloreado con nitrato de plata. En el carril 1 y 3 podemos observar la banda para el homocigoto de la variante polimórfica (AA) de 177 pb, en el carril 2, 7, 8 y 9 se observa al genotipo del homocigoto salvaje (GG) de 135 pb y en el carril 5, 6 y 10 los genotipos heterocigotos (AG).

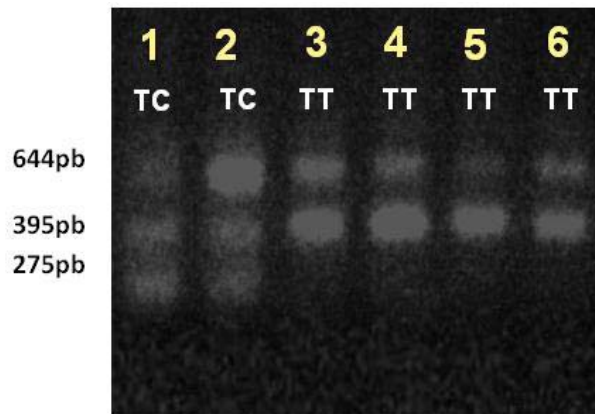


Figura 7. BI-PASA: Genotipos de 6 pacientes con EII para el polimorfismo T-1237C del gen *TLR9*, visualizado en gel de agarosa al 2% coloreado con gelred. En los carriles 1 y 2 se observa los genotipos heterocigotos (TC) de 395 pb y 275 pb. En los carriles 3, 4, 5 y 6 los genotipos del homocigoto silvestre (TT) de 395 pb. La banda de 644 pb es la que aparece en todos los carriles como el control positivo.

6.2 EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

Al analizar si las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en cada uno de los 3 grupos y en la población control, se encontró que ambos polimorfismos estaban en equilibrio de HW en la población control, así también, se observó que el polimorfismo T-1237C estaba en equilibrio de HW en los 3 grupos de estudio. Sin embargo, el polimorfismo G2848A no estuvo en equilibrio en los grupos 1 y 3, pero sí lo estuvo en el grupo 2 (tablas 7, 8 y 9). Así mismo, el análisis también se realizó dividiendo a los grupos por subtipo de enfermedad (EC y CU) como se observa en las tablas 7, 8 y 9.

Tabla 7. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo G2848A en el grupo 1.

SNP G2848A	EII N	χ^2	EC N	χ^2	CU N	χ^2
AA						
Obs.	19		11		7	
Esp.	31.49	4.95	17.72	2.55	11.56	1.80
AG						
Obs.	77		41		29	
Esp.	52.02	11.99	27.56	6.55	19.89	4.18
GG						
Obs.	9		4		7	
Esp.	21.49	7.26	10.72	4.21	8.56	0.28
TOTAL		24.20		13.31		6.25
<i>P</i>		< 0,001		< 0,001		0,01 - 0,02
Prueba del χ^2 (α = 0.05 ; GL = 1) = 3.84						
GL = Grados de libertad						

Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo G2848A en el grupo 2.

SNP G2848A	EII N	χ^2	EC N	χ^2	CU N	χ^2
AA						
Obs.	43		19		24	
Esp.	43.78	0.01	22.08	0.43	21.73	0.24
AG						
Obs.	75		45		59	
Esp.	73.43	0.03	38.84	0.98	54.45	0.60
GG						
Obs.	30		14		20	
Esp.	30.78	0.02	17.08	0.55	22.28	0.37
TOTAL		0.06		1.96		1.21
<i>P</i>		0,80 – 0,85		0,15 – 0,20		0,25 – 0,30
Prueba del χ^2 (α = 0.05 ; GL = 1) = 3.84						
GL = Grados de libertad						

Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo G2848A en el grupo 3.

SNP G2848A	EII N	χ^2	EC N	χ^2	CU N	χ^2
AA						
Obs.	62	2.34	30	2.40	31	0.16
Esp.	75.27		39.77		33.28	
AG						
Obs.	152	5.62	86	5.74	59	0.38
Esp.	125.45		66.46		54.45	
GG						
Obs.	39	3.37	18	3.44	20	0.23
Esp.	52.27		27.77		22.28	
TOTAL		11.33		11.58		0.77
P		< 0,001		< 0,001		0,35 – 0,40
Prueba del χ^2 (α = 0.05 ; GL = 1) = 3.84						
GL = Grados de libertad						

6.3 FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS

6.3.1 GRUPO 1 (PUCRS)

En el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo T-1237C, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y las alélicas en los pacientes con EII al ser comparadas con el grupo control ($P = 0.1688$ y $P = 0.214$, respectivamente) (tabla 10).

Sin embargo, para el polimorfismo G2848A se observó una diferencia significativa en las frecuencias genotípicas al ser comparadas con el grupo control ($P = 0.0000075$) mientras que en las frecuencias alélicas no se encontró diferencia significativa ($P = 0.679$) (tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el GRUPO 1, en la población con EII y controles

Genotipo/alelo	Polimorfismo en TLR9	Pacientes EII N (frec.)	Controles N (frec.)	P-value
Genotipos	T-1237C	100	239	0.1688 ^a
	TT	68 (0.68)	171 (0.72)	
	TC	25 (0.25)	62 (0.26)	
	CC	7 (0.07)	6 (0.02)	
Alelos	T	161 (0.81)	404 (0.85)	0.214 ^b
	C	39 (0.19)	74 (0.15)	
Genotipos	G2848A	105	239	0.0000075 ^a
	GG	9 (0.09)	58 (0.24)	
	GA	77 (0.73)	109 (0.46)	
	AA	19 (0.18)	72 (0.30)	
Alelos	G	95 (0.45)	225 (0.47)	0.679 ^b
	A	115 (0.55)	253 (0.53)	
^a χ^2 $\alpha = 0,05$; ^b Prueba exacta de Fisher $\alpha = 0,05$				

Cuando se realizó el análisis por subtipo de enfermedad, para el polimorfismo T-1237C no se encontraron diferencias significativas de las frecuencias genotípicas y las alélicas de los pacientes con EC y CU al ser comparadas con el grupo control (tabla 11).

Sin embargo, para el polimorfismo G2848A se observó una diferencia significativa en las frecuencias genotípicas de los pacientes con EC y CU al ser comparadas con el grupo control ($P = 0.0004$ y $P = 0.0076$, respectivamente) (tabla 11). Finalmente, al comparar a las poblaciones entre sí EC - CU, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas ($P = 0.770$ y $P = 0.8842$, respectivamente) (tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el GRUPO 1, por subtipo de enfermedad – controles y EC - CU.

<i>Genotipo/alelo</i>	<i>Polimorfismo TLR9</i>	<i>EC</i> <i>N (frec.)</i>	<i>P-value</i>	<i>CU</i> <i>N (frec.)</i>	<i>P-value</i>	<i>Controles</i> <i>N (frec.)</i>	<i>P-value EC - CU</i>
Genotipos	T-1237C	54		37		239	
	TT	37 (0.69)		24 (0.65)		171 (0.72)	
	TC	13 (0.24)	0.2192 ^a	11 (0.30)	0.3843 ^a	62 (0.26)	0.7742 ^a
	CC	4 (0.07)		2 (0.05)		6 (0.02)	
Alelos	T	87 (0.81)	0.314 ^b	59 (0.80)	0.329 ^b	404 (0.85)	1.000 ^b
	C	21 (0.19)		15 (0.20)		74 (0.15)	
Genotipos	G2848A	56		40		239	
	GG	4 (0.07)		4 (0.1)		58 (0.24)	
	GA	41 (0.73)	0.0004 ^a	29 (0.72)	0.0076 ^a	109 (0.46)	0.8842 ^a
	AA	11 (0.20)		7 (0.18)		72 (0.30)	
Alelos	G	49 (0.44)	0.599 ^b	176 (0.82)	0.904 ^b	225 (0.47)	0.770 ^b
	A	63 (0.56)		38 (0.18)		253 (0.53)	

^a χ^2 $\alpha = 0,05$; ^b Prueba exacta de Fisher $\alpha = 0,05$

El análisis de residuos de los genotipos nos dice que existe un aumento de heterocigotos en este grupo de pacientes con EII ($P = 0.000002$) (tabla 12). En el análisis de residuos de los genotipos por subtipo de enfermedad, se observó el incremento de heterocigotos en ambas poblaciones con EC y CU ($P = 0.0002$ y $P = 0.0016$, respectivamente) (tabla 13).

Tabla 12. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el GRUPO 1, en la población con EII y controles.

AJUSTE DE RESIDUOS			
SNP G2848A	GRUPO 1	CONTROL	P
Genotipos			
GG	-3.39	3.39	0.00071
GA	4.75	-4.75	0.000002
AA	-2.33	2.33	0.020

Tabla 13. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el *GRUPO 1*, en la población con subtipo de enfermedad (EC y CU) comparados con controles.

AJUSTE DE RESIDUOS				
Subtipo de enfermedad	SNP G2848A	GRUPO 1	CONTROL	<i>P</i>
	Genotipos			
EC	GG	-2.83	2.83	0.0046
	GA	3.72	-3.72	0.0002
	AA	-1.57	1.57	0.116
CU	GG	-2.01	2.01	0.014
	GA	3.15	-3.15	0.0013
	AA	-1.64	1.64	0.162

6.3.2 GRUPO 2 (HCPA)

En el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo T-1237C, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas ni en las alélicas al ser comparadas con el grupo control ($P = 0.5353$ y $P = 0.276$, respectivamente) (tabla 14). De la misma manera, en el análisis del polimorfismo G2848A, tampoco se encontraron diferencias significativas tanto en las frecuencias genotípicas como en las alélicas al ser comparadas con el grupo control ($P = 0.5704$ y $P = 0.711$, respectivamente) (tabla 15).

Tabla 14. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el GRUPO 2, en la población con EII y controles.

Genotipo/alelo	Polimorfismo en TLR9	Pacientes EII N (frec.)	Controles N (frec.)	P-value
Genotipos	T-1237C	148	239	0.5353 ^a
	TT	98 (0.66)	171 (0.72)	
	TC	45 (0.30)	62 (0.26)	
	CC	5 (0.03)	6 (0.02)	
Alelos	T	241 (0.81)	404 (0.85)	0.276 ^b
	C	55 (0.19)	74 (0.15)	
Genotipos	G2848A	148	239	0.5704 ^a
	GG	30 (0.20)	58 (0.24)	
	GA	75 (0.51)	109 (0.46)	
	AA	43 (0.29)	72 (0.30)	
Alelos	G	135 (0.46)	225 (0.47)	0.711 ^b
	A	161 (0.54)	253 (0.53)	
^a χ^2 $\alpha = 0,05$; ^b Prueba exacta de Fisher $\alpha = 0,05$				

Tabla 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el GRUPO 2, por subtipo de enfermedad y controles.

Genotipo/alelo	Polimorfismo TLR9	EC N (frec.)	P- value	CU N (frec.)	P- value	Controles N (frec.)	P- value EC - CU
Genotipos	T-1237C	78	0.3022 ^a	70	0.9616 ^a	239	0.6684 ^a
	TT	49 (0.62)		49 (0.70)		171 (0.72)	
	TC	26 (0.33)		19 (0.27)		62 (0.26)	
	CC	3 (0.04)		2 (0.03)		6 (0.02)	
Alelos	T	124 (0.79)	0.174 ^b	117 (0.84)	0.792 ^b	404 (0.85)	3.75 ^b
	C	32 (0.21)		23 (0.16)		74 (0.15)	
Genotipos	G2848A	78	0.1919 ^a	70	0.8258 ^a	239	0.1950 ^a
	GG	14 (0.18)		16 (0.23)		58 (0.24)	
	GA	45 (0.58)		30 (0.43)		109 (0.46)	
	AA	19 (0.24)		24 (0.34)		72 (0.30)	
Alelos	G	73 (0.47)	1.000 ^b	62 (0.44)	0.630 ^b	225 (0.47)	0.726 ^b
	A	83 (0.53)		78 (0.56)		253 (0.53)	
^a χ^2 $\alpha = 0,05$; ^b Prueba exacta de Fisher $\alpha = 0,05$							

6.3.3 GRUPO 3 (PUCRS Y HCPA)

Al analizar las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo T-1237C, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas ($P = 0.3017$ y $P = 0.175$, respectivamente) al compararlas con el grupo control (tabla 16).

Sin embargo, para el polimorfismo G2848A, se observó diferencia significativa cuando se compara las frecuencias genotípicas con el grupo control (P de Pearson redondeado, **$P = 0.004$**), mientras en las frecuencias alélicas no se observó significancia ($P = 0.654$) (tabla 16).

Tabla 16. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el GRUPO 3, en la población con EII y controles.

Genotipo/alelo	Polimorfismo en TLR9	Pacientes EII N (frec.)	Controles N (frec.)	P-value
Genotipos	T-1237C	248	239	0.3017 ^a
	TT	166 (0.67)	171 (0.72)	
	TC	70 (0.28)	62 (0.26)	
	CC	12 (0.05)	6 (0.02)	
Alelos	T	402 (0.81)	404 (0.85)	0.175 ^b
	C	94 (0.19)	74 (0.15)	
Genotipos	G2848A	253	239	0.0037 *
	GG	39 (0.15)	58 (0.24)	
	GA	152 (0.60)	109 (0.46)	
	AA	62 (0.25)	72 (0.30)	
Alelos	G	230 (0.45)	225 (0.47)	0.654 ^b
	A	276 (0.55)	253 (0.53)	

^aχ² α = 0,05; ^b Prueba exacta de Fisher α = 0,05

* P de Pearson (chi-cuadrado) = **0.004** [3.8E⁻³]

Cuando se realizó el análisis por subtipo de enfermedad (EC y CU), cada subgrupo comparado con el grupo control, no se encontró diferencias significativas alélicas y genotípicas en el polimorfismo T-1237C, mientras que en el polimorfismo G2848A hubo diferencias significativas en las frecuencias genotípicas en el grupo de los

pacientes con EC – Control (**$P = 0.0019$**), pero en las frecuencias alélicas no se encontró diferencia significativa ($P = 0.127$) (tabla 17). Al comparar a los pacientes entre sí con EC y CU, no se encontró ninguna diferencia significativa en ambos polimorfismos (tabla 17).

Tabla 17. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en estudio para el GRUPO 3, por subtipo de enfermedad - controles y EC - CU.

Genotipo/alelo	Polimorfismo TLR9	EC N (frec.)	P- value	CU N (frec.)	P- value	Controles	P- value EC –CU
	T-1237C	132		107		239	
Genotipos	TT	86 (0.65)	0.2364 ^a	73 (0.68)	0.6901 ^a	171 (0.72)	0.8469 ^a
	TC	39 (0.30)		30 (0.28)		62 (0.26)	
	CC	7 (0.05)		4 (0.04)		6 (0.02)	
Alelos	T	211 (0.80)	0.127 ^b	176 (0.82)	0.503 ^b	404 (0.85)	0.559 ^b
	C	53 (0.20)		38 (0.18)		74 (0.15)	
	G2848A	134		110		239	
Genotipos	GG	18 (0.13)	0.0019*	20 (0.18)	0.3181 ^a	58 (0.24)	0.2482 ^a
	GA	86 (0.64)		59 (0.54)		109 (0.46)	
	AA	30 (0.23)		31 (0.28)		72 (0.30)	
Alelos	G	122 (0.46)	0.703 ^b	99 (0.45)	0.625 ^b	225 (0.47)	0.927 ^b
	A	146 (0.54)		121 (0.55)		253 (0.53)	

^a χ² α = 0,05 ; ^b Prueba exacta de Fisher α = 0,05

* P de Pearson (chi-cuadrado) = 0.002 [1.9E⁻³]

El análisis de residuos nos dice que existe un aumento de heterocigotos en este grupo de pacientes con EII (**$P = 0.0013$**). En el análisis de residuos por subtipo de enfermedad, se observó la presencia de más heterocigotos en la población con EC (**$P = 0.00057$**) (tablas 18 y 19).

Tabla 18. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el **GRUPO 3**, en la población con EII y controles.

AJUSTE DE RESIDUOS			
SNP G2848A	GRUPO 3	CONTROL	<i>P</i>
Genotipos			
GG	-2.47	2.47	0.014
GA	3.21	-3.21	0.0013
AA	-1.40	1.40	0.162

Tabla 19. Análisis de residuos de los genotipos para el polimorfismo G2848A para el **GRUPO 3**, en la población con EC y controles.

AJUSTE DE RESIDUOS			
SNP G2848A	GRUPO 3	CONTROL	<i>P</i>
Genotipos			
GG	-2.49	2.49	0.013
GA	3.45	-3.45	0.00057
AA	-1.61	1.61	0.108

6.4 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

En los análisis de haplotipos no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos de los pacientes con EII al compararlos con el grupo control (tabla 11), tampoco se encontró haplotipos significantes cuando el análisis se realizó por subtipo de enfermedad y el grupo control (tabla 20, 21 y 22).

Tabla 20. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen *TLR9* en la población con EII vs. Controles, para cada uno de los casos.

HAPLOTIPOS		Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	Grupo 3 N (%)	Controles N (%)
G2848A	T-1237C				
G	T	89 (42,2%)	123 (41,5%)	212 (41,8%)	209 (43,8%)
G	C	11 (5,3%)	12 (4,1%)	23 (4,6%)	14 (2,8%)
A	T	81 (38,6%)	118 (39,9%)	199 (39,4%)	194 (40,5%)
A	C	29 (13,9%)	43 (14,5%)	72 (14,2%)	61 (12,8%)
Total		210	296	506	478
P– value		0,4797	0,7082	0,5004	
$\chi^2 \alpha = 0,05$					
N = número de cromosomas					

Tabla 21. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen *TLR9* en la población con EC vs. Controles, para cada uno de los casos.

HAPLOTIPOS		Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	Grupo 3 N (%)	Controles N (%)
G2848A	T-1237C				
G	T	45 (40%)	68 (43,3%)	113 (42,0%)	209 (43,8%)
G	C	6 (5%)	6 (3,6%)	12 (4,2%)	14 (2,8%)
A	T	45 (40%)	57 (35,8%)	102 (37,8%)	194 (40,5%)
A	C	16 (15%)	27 (17,3%)	43 (16,0%)	61 (12,8%)
Total		112	158	270	478
P– value		0,5328	0,452	0,4024	
$\chi^2 \alpha = 0,05$					
N = número de cromosomas					

Tabla 22. Frecuencias de haplotipos de los polimorfismos G2848A y T-1237C del gen *TLR9* en la población con Cu vs. Controles, para cada uno de los casos.

HAPLOTIPOS		Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	Grupo 3 N (%)	Controles N (%)
G2848A	T-1237C				
G	T	34 (42,5%)	56 (40,1%)	90 (41,1%)	209 (43,8%)
G	C	6 (7,5%)	6 (4,2%)	12 (5,3%)	14 (2,8%)
A	T	30 (37,6%)	61 (43,5%)	91 (41,3%)	194 (40,5%)
A	C	10 (12,4%)	17 (12,2%)	27 (12,3%)	61 (12,8%)
Total		80	140	220	478
P– value		0,2765	0,7065	0,4089	
$\chi^2 \alpha = 0,05$					
N = número de cromosomas					

7. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha tomado mucha importancia al estudio de la fisiopatología e inmunogenética de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) debido a que su etiología aún permanece desconocida. El fenotipo resultante de esta enfermedad es consecuencia de múltiples interacciones entre factores ambientales, la flora entérica y la respuesta del individuo a ese ambiente, siendo esta última determinada principalmente por factores inmunogenéticos (Ferguson *et al.*, 2007).

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa son clasificadas en el mismo grupo de enfermedad inflamatoria intestinal debido a que algunos de sus síntomas son comunes, sin embargo, estas presentan diferentes características que las diferencian, como la forma de presentación, los órganos afectados y el direccionamiento de la respuesta inmune (Dignas *et al.*, 2004, Sands *et al.*, 2007) (anexo 2). Por esa razón, el presente trabajo se realizó además por subtipo de enfermedad (EC y CU) y entre los mismos subtipos.

Muchos estudios han reportado que los TLRs del sistema inmune innato son los mediadores claves en la defensa inmune innata del intestino, encargándose de mantener la mucosa y la homeostasis comensal. Se encontró, que profilácticamente, los motivos de CpG no metilados en el DNA protege al ratón reduciendo la severidad de una subsecuente colitis inducida y además existe un efecto protector de las bacterias probióticas mediadas por TLR9 en modelos experimentales con colitis (Rachmilewitz *et al.*, 2002). Otro trabajo demostró que el ADN_{fi} actúa como un adjuvante inmunológico natural y el TLR9 críticamente controla el balance entre la frecuencia y función de células Treg y Teff (Hall *et al.*, 2008) (Figura 4).

Estas observaciones están relacionadas a la señalización apical y basolateral del TLR9 en las células epiteliales intestinales. La señal basolateral del TLR9 promueve la degradación de I κ B α y la activación de la vía NF- κ B, mientras la estimulación apical del TLR9 conlleva a la estimulación citoplasmática de I κ B α ubiquitinada, lo cual previene la activación de NF- κ B y confiere tolerancia al subsecuente desafío del TLR (Lee *et al.*, 2006), por lo que observamos que el TLR9 juega un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y en la regulación de la tolerancia bacteriana e inflamación.

Los polimorfismos del gen *TLR9* analizados en el presente estudio fueron identificados por Lazarus *et al.* (2003), quienes realizaron una búsqueda de SNPs en este gen que estaban asociados a diferentes enfermedades en 3 grupos étnicos diferentes, encontrando que las variantes alélicas -1237C y 2848A fueron los haplotipos más significantes del total evaluado. Trabajos posteriores utilizaron como base estos polimorfismos para su asociación con diferentes enfermedades originadas por una deficiencia en el sistema inmune innato.

Al realizar un estudio piloto para estos 2 SNPs en una población alemana afectada por la enfermedad de Crohn, se encontró un incremento significativo de la variante alélica -1237C al compararlo con el grupo control (19.3% vs. 11.9%, $P = 0.0036$), mientras que la variante 2848A no fue significativo (Torok *et al.*, 2004). Posteriormente este mismo grupo de científicos realizó un estudio de ligamiento de estos 2 polimorfismos con otros loci de susceptibilidad a EII (*NOD2*, *IL23R*, *ATG16L1*) en una población alemana con EC y encontraron una interacción significativa de la variante -1237C con estos loci (Torok *et al.*, 2009).

Nuestro estudio abarcó a dos poblaciones de pacientes eurodescendientes del sur de Brasil diagnosticados con EII y provenientes de dos centros de salud de Porto Alegre (estado de Rio Grande del Sur). Para efectos del análisis, se dividió a la población en 3

grupos de estudio: grupo 1 (pacientes del Hospital de la PUCRS), grupo 2 (pacientes del HCPA) y el grupo 3 (pacientes de ambos centros de salud). Al analizar el grupo 3, para saber si toda la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, se observó que no lo estaba para el polimorfismo G2848A y para saber cuál de ambas poblaciones (PUCRS o HCPA) era la causante de este desequilibrio, se procedió a analizar a las poblaciones por separado (grupo 1 y 2), lo cual nos confirmó que la población de la PUCRS era la que no estaba en equilibrio y era la que ocasionaba que toda la población (grupo 3) no se encuentre en equilibrio. Sin embargo, fueron considerados los análisis para el grupo 3 debido a que un reciente reporte en una población del Sur de Brasil, sobre receptores de inmunoglobulinas del tipo asesinas, utilizaron las mismas poblaciones de ambos centros hospitalarios y las consideraron como una sola para sus análisis (Wilson *et al.*, 2010).

Los resultados muestran que existen diferencias significativas en las frecuencias genotípicas del polimorfismo G2848A en pacientes con EII del grupo 1 y grupo 3 cuando se comparan con el grupo control (tablas 10 y 16) y para saber cuál de los genotipos estaba con mayor incidencia, por ello se procedió a analizar el *P*-residual para cada uno de los genotipos de este polimorfismo en esos grupos comparados con el control. Se observó que existe un alto incremento de heterocigotos A/G, encontrándose un papel significativo del genotipo heterocigoto en los pacientes con EII (tablas 12 y 18). Esto también se observó cuando se analizó por subtipo de enfermedad, siendo estadísticamente significativa la frecuencia del genotipo heterocigoto en el grupo 3 - control para la EC y en el grupo 1 – control para la EC y CU (tablas 13 y 19).

A pesar de que no se obtuvo valores significativos de las frecuencias alélicas en todos los grupos de estudio vs. control, estos resultados pueden sugerir que este incremento del genotipo A/G en los pacientes con EII, podría considerarse como un factor

de susceptibilidad en las poblaciones estudiadas, ya que muchas enfermedades están determinadas por la presencia del genotipo y no por la presencia de un alelo, como por ejemplo el caso de la hemofilia ($XhXh$: hemofílica; Xh^+Xh : portadora; Xh^+Xh^+).

En ninguno de los casos se encontró diferencia significativa en los alelos y genotipos en el polimorfismo T-1237C a diferencia de trabajos anteriores en donde el principal rol es atribuido al polimorfismo T-1237C (Torok *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007, Torok *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestra un rol significativo del polimorfismo G2848A. De esta manera puede considerarse que lo observado podría ser consecuencia de 3 factores importantes. El primero, puede estar atribuido a la existencia de las diferentes etnias las cuales están determinadas por una heterogeneidad genética repartidas en todo el mundo, pues nuestro estudio abarcó a una población del Sur del Brasil y nuestros resultados podrían extrapolarse sólo para esta parte del país, debemos tener en cuenta que Brasil es una de las más heterogéneas del mundo, con poblaciones de origen eurodescendientes, afrodescendientes y nativos americanos, debido a la existencia de nativos alrededor de 2.5 millones de años antes de la inmigración europea y esclavos del continente africano quienes llegaron en la segunda mitad del siglo 15 y continuó hasta 1850, este factor debe ser considerado en todos los estudios de asociación de enfermedades caso- control (Santos, Ney *et al.*, 2009).

El segundo factor, está atribuido al tamaño de la muestra, pues se sabe que los datos significativos encontrados corresponden al grupo 1 ($N = 96$) y este tamaño de la población pudo haber influenciado estadísticamente en los resultados, mientras que el grupo 2 ($N = 148$) estaría mejor soportado estadísticamente. Sin embargo, como nuestro trabajo fue un estudio piloto de exploración consideramos que estos números son relativamente buenos ya que es un poco difícil trabajar en poblaciones humanas con enfermedades de un gran tamaño muestral.

El tercer factor importante a considerar para explicar la asociación del polimorfismo G2848A con esta enfermedad en nuestras poblaciones, es el hecho de que los pacientes del grupo 1 que corresponden al Hospital de San Lucas (PUCRS), es un centro hospitalario de referencia en el estudio y tratamiento de la EII en el sur del Brasil, siendo los casos más graves provenientes de este centro, esto podría condicionar de cierta manera los resultados obtenidos. Es por ello que estudios de asociación con los datos clínicos se complementan con los datos de frecuencias génicas para poder tener una mejor visión de la influencia de los genes en las enfermedades. Lamentablemente nuestro estudio no lo realizó debido a que estos datos los teníamos incompletos y en la actualidad aún están siendo colectados.

El análisis de haplotipos en las poblaciones con EII, EC y CU comparados con los controles, para cada uno de los grupos, no dieron resultados estadísticamente significantes que puedan estar relacionados con la enfermedad.

Se ha observado de que la expresión del TLR9 es particularmente alta en células Paneth, las cuales también expresan fuertemente el NOD2 (Lala *et al.*, 2003). Debido a que los genes *TLR9* y *NOD2* se co-expresan cerca a los gránulos secretorios en el compartimiento de las células Paneth, se puede indicar que la doble señalización a través de estos dos genes es necesario para el reconocimiento eficiente de bacterias y la liberación de productos antimicrobianos (como las defensinas) dentro de las criptas de la mucosa intestinal (Lala *et al.*, 2003; Rumio *et al.*, 2004). De acuerdo a esto, un grupo de investigadores encontraron que el polimorfismo T-1237C mostró una interacción significativa con mutaciones del gen *NOD2*, siendo su frecuencia significativamente más alta en pacientes con EC con al menos una mutación en el gen *NOD2* ($P = 0.004$ vs. controles, OR 1.60, 95%IC 1.15 - 2.21). Estos resultados sugieren que la deficiente función de ambos receptores, podría ser consecuencia de los polimorfismos a nivel de

nucleótido, los cuales estarían asociado con el riesgo incrementado de la EII por el inapropiado reconocimiento innato del patógeno (Torok *et al.*, 2009).

8. CONCLUSIONES

- Nuestro estudio muestra que el genotipo heterocigoto A/G de la variante alélica 2848A está asociado con la EII en la población constituida por los pacientes del Hospital de la PUCRS.
- No se encontraron resultados estadísticamente significativos en las frecuencias alélicas del polimorfismo T-1237C al comparar a todos los grupos con el control.
- No se encontró ningún resultado estadísticamente significativo en el análisis de haplotipos de ambos polimorfismos, en las poblaciones con EII, EC y CU comparados con el grupo control.
- Nuestros resultados podrían estar influenciados por: la heterogeneidad genética de las diferentes poblaciones étnicas en el Brasil, el tamaño muestral de la población o un posible condicionamiento del fenotipo de los pacientes provenientes del Hospital de San Lucas (PUCRS), los cuales en su mayoría son casos de gravedad.

9. RECOMENDACIONES

- El bajo número de individuos influencia el poder de soporte estadístico en un estudio poblacional, debido a eso, se requiere considerar un tamaño muestral considerable para que este no sea un factor que interfiera en el análisis de los resultados.
- Análisis de asociación con los datos clínicos (genotipo-fenotipo) son complementarios con los estudios de análisis de frecuencias génicas para hacer una asociación más real con las enfermedades.
- Realizar replicas independientes de los resultados en una segunda muestra que permitirán reforzar los resultados obtenidos en los trabajos que emplean estudios caso – control.
- Llevar a cabo estudios en modelos experimentales (*knockout*, *knock-in* y transgénesis) para confirmar las vías alternativas determinadas por los polimorfismos del gen *TLR9* que conllevan a anormalidades funcionales.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AKIRA, Shizuo AND TAKAEDA, Kiyoshi. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2004, vol. 4, n° 7, p. 499-511.
- ARDIZZONE, S.; MACONI, G.; BIANCHI, V.; RUSSO, A.; COLOMBO, E.; CASSINOTTI, A.; PENATI, C.; TENCHINI, M.L. and BIANCHI PORRO, G. Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007, vol. 13, n° 5, p. 516-523.
- Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn. 2007. Disponible en: <http://www.abcd.org.br>. Acceso el: 5 de Mayo de 2010.
- BELL, Jessica; MULLEN, Gregory; LEIFER, Cynthia; MAZZONI Alessandra; DAVIES, David and SEGA, David. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*. 2003, vol. 24, n° 10, p. 528 - 533.
- BENDAÑO, Teófilo Y FRISANCHO, Oscar. Perfil clínico y evolutivo de la enfermedad de Crohn en el Hospital Rebagliati (Lima-Perú). *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2010, vol. 30, n° 1, p. 17-24.
- BERGHÖFER, B; KÖNIG, I; ZIEGLER, A; CHAKRABORTY, T; BEIN, G; HACKSTEIN, H; Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy*. 2005, vol. 35, n° 9, p. 1147-1154.
- BERNSTEIN, Charles; WAJDA, Andre; SVENSON, Lawrence; MACKENZIE, Adrian; KOEHOORN, Mieke; JACKSON, Maureen; FEDORAK, Richard; ISRAEL, David and BLANCHARD, James. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2006. vol. 101, n° 7, p. 1559-1568.
- BEUTLER, Bruce; JIANG, Zhengfan; GEORGEL, Philippe; CROZAT, Karine; CROKER, Ben; RUTSCHMANN, Sophie, DU, Xin and HOEBE, Kasper. Genetic Analysis of Host Resistance: Toll-Like Receptor Signaling and Immunity at Large. *Annu. Rev. Immunol.* 2006, vol. 24, p.353-389.
- BOWIE, Andrew and O'NEILL, Luke. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*. 2000, vol. 67, n°4, p. 508-514.

- CALDERÓN, Augusto; FRISANCHO, Oscar; YOZA, Max Y RUIZ, Edwin. Perfil clínico y epidemiológico de la colitis ulcerativa en un Hospital de Lima. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2004, vol. 24, n° 2, p. 135-142.
- Cario, Elke. Toll-like Receptors in Inflammatory Bowel Diseases: A Decade Later. *Inflamm Bowel Dis*. 2010, vol.16, n° 9, p.1583-1597.
- Cario, Elke. Bacterial Interactions with Cells of the Intestinal Mucosa: Toll-like Receptors and NOD2. *Gut*. 2005, vol. 54, p. 1182-1193.
- CARTER, M.J.; LOBO, A.J. and TRAVIS, S.P. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2004, vol. 53, n° 5, p. 1-16.
- CARVALHO, A.; MARQUES, A.; MACIEL, P. AND RODRIGUES, F. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Molecular and Cellular Probes*. 2007, vol. 21, n° 4, p. 316-320.
- CHENG, Pei-Lin; ENG, Hock-Liew; CHOU, Ming-Huei; YOU, Huey-Ling AND LIN, Tsun-Mei. 2007. Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. *Translational Research*. 2007, vol. 150, n° 5, p. 311-318.
- DIGNASS, A.U.; BAUMGART, D.C. and STURM, A. Review article: the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease--immunology and repair mechanisms. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2004, vol. 20, suppl. 4, p. 9-17.
- DUBINSKY, Marla C.; TAYLOR, Kent; TARGAN, Stephan R. and ROTTER, Jerome I. Immunogenetic phenotypes in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, vol. 12, n° 23, p. 3645-3650.
- FERGUSON, Lynnette R.; SHELLING, Andrew N.; BROWNING, Brian L.; HUEBNER, Claudia and PETERMANN, Ivonne. Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutation Research*. 2007, vol. 622, n° 1-2, p. 70-83.
- FIGUEROA, Carolina; QUERA, Rodrigo; VALENZUELA, Jorge Y JENSEN, Christian. Enfermedades Inflamatorias Intestinales: Experiência de dos centros chilenos. *Revista Médica de Chile*. 2005, vol. 133, n° 11, p. 1295-1304.
- GLAS, Jurgen; SEIDERER, Julia; WETZKE, Martin; KONRAD, Astrid; TOROK, Helga-Paula; SCHMECHEL, Silke; TONENCHI, Laurian; GRASSL, Christine; DAMBACHER, Julia; PFENNIG, Simone; MAIER, Kerstin; GRIGA, Thomas;

KLEIN, Wolfram; EPPLEN, Jorg; SCHIEMANN, Uwe; FOLWACZNY, Christian; LOHSE, Peter; GOKE, Burkhard; OCHSENKUHN, Thomas; MULLER-MYHSOK, Bertram; FOLWACZNY, Matthias; MUSSACK, Thomas and BRAND, Stephan. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE*. 2007, vol. 2, n° 9, p. e819.

- HALL, Jason; BOULADOUX, Nicolas; MING, Cheeng; WOHLFER, Elizabeth; BLANK, Rebecca; ZHU, Qing; GRIGG, Michael; BERZOFSKY, Jay and BELKAID, Yasmine. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity*. 2008, vol. 29, n° 4, p.637-649.
- HONG, Jiwon; LEUNG, Euphemia; FRASER, Alan G.; MERRIMAN, TONY R.; VISHNU, PRAKASH and KRISSANSEN, GEOFFREY W. *TLR2*, *TLR4* and *TLR9* polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007, vol. 22, n° 11, p. 1760-1766.
- HUR, J; Shin, H; Park, B;Kim, L; Kim, S and Bae S. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2005, vol. 65, n° 3, p. 266-270.
- IBD WORKING GROUP OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC GASTROENTEROLOGY, HEPATOLOGY AND NUTRITION. Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis--the Porto criteria. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2005, vol. 41, n° 1, p. 1-7.
- JANEWAY, Charles AND MEDZHITOV, Ruslan. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002, vol. 20, p. 197-216.
- LACHHEB, J; DHIFALLAH, I; CHELBI, K and HAMZAOU, A. Toll-like receptors and CD14 genes polymorphisms and susceptibility to asthma in Tunisian children. *Tissue Antigens*. 2008, vol. 71, n° 5, p. 417-425.
- LADE, Beatriz; BIANCHI, Carla Y ESPÍNDOLA, Fabiana. Características clínicas de presentación y evolutivas de una cohorte de 48 pacientes con enfermedad de Crohn en Uruguay. *Revista Medica de Uruguay*. 2005, vol. 21, p. 303-307.
- LAHIRI, Debomoy and NURNBERGER, John. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*. 1991, vol. 19, n° 19, p. 5444.

- LAKATOS, Peter L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down?. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, vol. 12, n° 38, p. 6102-6108.
- LAKATOS, Laszlo; MESTER, Gabor; ERDELYI, Zsuzsanna; BALOGH, Mihaly; SZIPOCS, Istvan; KAMARAS, Gyorgy and LAKATOS, Peter L. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World Journal of Gastroenterology*. 2004, vol. 10, n° 3, p. 404-409.
- LALA, Sanjay; OGURA, Yasunori; OSBORNE, Caroline YING, Sok Hor; BROMFIELD, Annabel; DAVIES, Susan, OGUNBIYI Olagunju, GABRIEL NUÑEZ, Gabriel and KESHAV, Satish. Crohn's Disease and the NOD2 Gene: A Role for Paneth Cells. *Gastroenterology*. 2003, vol. 125, n° 1, p. 47–57.
- LAZARUS, Ross; KLIMECKI, Walter T.; RABY, Benjamin A; VERCELLI, Donata; PALMER, Lyle J.; KWIATKOWSKI, David J.; SILVERMAN, Edwin K.; MARTINEZ, Fernando AND WEISS, Scott T. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*. 2003. vol. 81, n° 1, p. 85-91.
- LEE, Jongdae; MO, Ji-Hun; KATAKURA, Kyoko; ALKALAY, Irit; RUCKER, Adam; LIU, Yu-Tsueng; LEE, Hyun-Ku; SHEN, Carol; COJOCARU, Gady; SHENOUDA, Steve; KAGNOFF, Martin; ECKMANN, Lars; BEN-NERIAH, Yinon and RAZ, Eyal. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature Cell Biology*. 2006, vol. 8, n° 12, p.1327 – 1336.
- LEMAITRE, Bruno; NICOLAS, Emmanuelle; MICHAUT, Lydia; REICHHART ,Jean-Marc and HOFFMANN, Jules. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. 1996, vol. 86, n° 6, p. 973 - 983.
- LINARES DE LA CAL, J.A.; CANTÓN, C.; HERMIDA, C.; PÉREZ-MIRANDA, M. AND MATÉ-JIMÉNEZ, J. Estimated incidence of inflammatory bowel disease in Argentina and Panama (1987-1993). *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 1999, vol. 91, p. 277-286.
- LIBIOULLE, Cécile; LOIS, Edouard; HANSOUL, Sarah; SANDOR, Cynthia; FARNIR, Frédéric; FRANCHIMONT, Denis; VERMEIRE, Séverine; DEWIT, Olivier;

- DE VOS, Martine; DIXON, Anna; DEMARCHE, Bruno; GUT, Ivo; HEATH, Simon; FOGLIO, Mario; LIANG, Liming; LAUKENS, Debby; MNI, Myriam; ZELENKA, Diana; VAN GOSSUM, André; RUTGEERTS, Paul; BELAICHE, Jacques; LATHROP, Mark and GEORGES, Michel. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genetics*. 2007, vol. 3, n° 4, p. e58.
- LIU, Qiang; THORLAND, Erik C.; HEIT, John A. and SOMMER, Steve S. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: A rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Research*. 1997, n° 7, p. 389-398.
 - MIZOGUCHI, Emiko; MIZOGUCHI, Atsushi; TAKEDATSU, Hidetoshi; CARIO, Elke; DE JONG, Ype P.; OOI, Choon Jin; XAVIER, Ramnik J.; TERHORST, Cox; PODOLSKY, Daniel K. and BHAN, Atul K. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology*. 2002, vol. 122, n° 1, p.134-144.
 - NCBI (National Center for Biotechnology Information). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/605474>
 - NOBLE, Colin; NIMMO, Elaine; GAYA, Daniel; RUSSELL, Richard K and SATSANGI, Jack. Novel susceptibility genes in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, vol. 12, n° 13, p. 1991-1999.
 - NOGUCHI, E; NISHIMURA, F; FUKAI, H; KIM, J; ICHIKAWA, K; SHIBASAKI, M. and ARINAMI, T. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy*. 2004, vol. 34, n°2, p. 177-83.
 - O'HARA, Ann M. and SHANAHAN, Fergus. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 2006, vol.7, n° 7, p. 688-693.
 - OLIVEIRA, Genoile; COSTA, Luiz; ALMEIDA, Tamara; DOS REIS, Lidiane; CARVALHO, Jorge; TORALLES, Maria AND CASTRO, André. Crohn's disease in one mixed-race population in Brazil. *World Journal of Gastroenterology*. 2007, vol. 13, n° 33, p. 4489-4492.
 - PAPP, M.; LAKATOS, P.L.; PALATKA, K.; FOLDI, I.; UDVARDY, M.; HARSFALVI, J.; TORNAI, I.; VITALIS, Z.; DINYA, T.; KOVACS, A.; MOLNAR, T.; DEMETER, P.; PAPP, J.; LAKATOS, L. and ALTORJAY, I. Haptoglobin polymorphism in patients

with inflammatory bowel diseases. *Orvosi hetilap*. 2006, vol. 147, n° 36, p. 1745-1750.

- PEIXOTO-RANGEL, Alba L.; MILLER, E. Nancy; CASTELLUCCI, Léa; JAMIESON, Sarra E.; GUERRA PEIXE, Ricardo; DE SOUZA ELIAS, Liliani; CORREA-OLIVEIRA, Rodrigo; BAHIA-OLIVEIRA, Lílían M.G. and BLACKWELL, Jenefer M. Candidate gene analysis of ocular *toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9)*. *Memórias do Insituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2009, vol. 104, n° 8, p. 1187-1190.
- POLTORAK, Du X.; WEI, Y. and BEUTLER, B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *European Cytokine Network*. 2000, vol. 11, n° 3, p. 362-371.
- RAKOFF-NAHOUM, Seth; PLAGINO, Justin; ESLAMI-VARZANEH, Fatima; EDBERG, Stephen and MEDZHITOV, Ruslan. Recognition of commensal microflora by Toll-Like Receptors is Required for Intestinal Homeostasis. 2004. *Cell Press*. vol.118, p.229-241.
- RAVIKUMARA, M. and SANDHU, B. K. Epidemiology of inflammatory bowel diseases in childhood. *Indian Journal Pediatrics*. 2006, vol. 73, n° 8, p.717-721.
- RACHMILEWITZ, Daniel; KARMELI, Fanny; TAKABAYASHI, Kenji; HAYASHI Tomoko; LEIDER-TREJO, Leonor; LEE, Jongdae; LEONI, Lorenzo and RAZ Eyal. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*. 2002, vol. 122, n° 5, p. 1428 – 1441.
- RICKHAM, P.P. Human experimentation. Code of ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *British Medical Journal*. 1964, vol. 2, n° 5402, p.177.
- ROTHFUSS, Katja S.; STANGE, Eduard F. and HERRLINGER, Klaus R. Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, vol.12, n° 30, p.4819-4831.
- RUMIO, Cristiano; BESUSSO, Dario; PALAZZO, Marco; SELLERI, Silvia; SFONDRINI, Lucia; DUBINI, Francesco; ME'NARD, Sylvie and BALSARI Andrea. Degranulation of Paneth Cells via Toll-Like Receptor 9. *AJP*. 2004, vol. 165, n° 2, p. 373 - 381.
- SANDS, Bruce. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *Journal of Gastroenterology*. 2007, vol. 42, n° 1, p.16-25.

- SANTOS, Ney P. C.; RIBEIRO-RODRIGUES, Elzemar M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Andrea K. C.; PEREIRA, Rui; GUSMAO, Leonor; AMORIM, Antonio; GUERREIRO, JOAO F.; ZAGO, Marco A.; MATTE, CECILIA; HUTZ, Mara H. and SANTOS, Sidney E. B. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) panel. *Human Mutation*. 2010, vol. 31, n° 2, p. 184-190.
- SMIT, Lidwien; SIROUX Valérie; BOUZIGON, Emmanuelle.; ORYSZCZYN, Marie-Pierre; LATHROP, Mark; DEMENAI, Florence and KAUFFMANN, Francine. CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009, vol. 179, n° 5, p. 363-368.
- SOUZA, Marcellus; TRONCON, Luiz; RODRIGUES, Carla; VIANA, Cyntia; ONOFRE, Pedro; MONTEIRO, Rosane; PASSOS, Afonso; MARTINELLI, Ana and MENEGHELLI, Ulysses. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2002, vol. 39, n° 2, p. 98-105.
- STROBER, Warren; FUSS, Ivan. and MANNON, Peter. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal Clinical Investigation*. 2007, vol. 117, n° 3, p.514-21.
- TOROK, Helga; GLASS, Jurgen; ENDRESS, Ilona; TONENCHI, Laurian; TESHOME, Molla; WETZKE, Martin; KLEIN, Wolfram; LOHSE, Peter; OCHSENKUHN, Thomas; FOLWACZNY, Matthias; GOKE, Burkhard; FOLWACZNY, Christian; MULLER-MYHSOCK, Bertram and BRAND, Stephan. Epistasis Between Toll-Like Receptor-9 Polymorphism and Variants in *NOD2* and *IL23R* Modulates Susceptibility to Crohn's Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2009, vol. 104, p. 1723-1733.
- TOROK, Helga; GLAS, Jurgen and TONENCHI, Laurian. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. *Gastroenterology*. 2004, vol. 127, n°1, p. 365-366.
- VAN LIMBERGEN, Johan; RUSSELL, Richard; NIMMO, Elaine; HO, Gwo-Tzer; ARNOTT, Ian; WILSON, David and SATSANGI, Jack. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*. 2007, v.13, n°3, p.338-55.

- WANG, Yu; OUYANG, Qin; and HU, Ren. Progression of inflammatory Bowel Disease in China. *Journal of Digestive Diseases*. 2010, vol. 11, n° 2, p. 76–82.
- WILSON, Timothy; JOBIM, Mariana; JOBIM, Luiz; PORTELA, Pamela; SALIM, Patricia; ROSITO, Mario; DAMIN, Daniel; FLORES, Cristina; PERES, Alessandra; BRENNER, Marta; BOGO José; SCHWARTSMANN, Gilberto and ROESLER, Rafael. Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Human Immunology*. 2010, vol. 71, p. 293–297.
- WU, Wenhui; WEIGAND, Luise; BELKAID, Yasmine and MENDEZ, Susana. Immunomodulatory effects associated with a live vaccine against *Leishmania major* containing CpG oligodeoxynucleotides. 2006. *European Journal of Immunology*. 2006, vol. 36, n° 12, p. 3238 – 3247.
- XAVIER, R.J. and PODOLSKY, D.K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007, vol. 448, n° 7152, p. 427-434.

11. ANEXOS

11. 1 ANEXO I

11.1.2 REGISTRO DE DATOS

POLIMORFISMO T-1237C	POLIMORFISMO G2848A
0 = TT	0 = AA
1 = CT	1 = AG
2 = CC	2 = GG
C = alelo mutante	A = alelo mutante
T = alelo silvestre	G = alelo silvestre

11.1.3 GENOTIPAJES DE LOS PACIENTES Y CONTROLES:

PACIENTES DEL HOSPITAL DE LA PUCRS				
N	CÓDIGO DE MUESTRA	DIAGNÓSTICO	TLR9 G2848A	TLR9 T- 1237C
1	IBD01	EC	1	1
2	IBD02	CU	1	0
3	IBD03	EC	1	0
4	IBD04	CU	1	0
5	IBD05	EC	1	0
6	IBD06	EC	1	1
7	IBD07	CU	1	1
8	IBD08	EC	1	0
9	IBD09	EC	1	2
10	IBD010	CU	1	2
11	IBD011	EC	1	0
12	IBD012	CU	1	1
13	IBD013	CU	1	0
14	IBD014	EC	1	1
15	IBD015	EC	1	0
16	IBD016	CU	2	1
17	IBD017	CU	1	0
18	IBD018	CU	1	0

19	IBD019	EC	1	0
20	IBD020	EC	0	1
21	IBD021	CU	1	0
22	IBD022	EC	0	0
23	IBD023	CU	1	1
24	IBD024	EC	1	0
25	IBD025	EC	1	1
26	IBD026	CU	1	0
27	IBD027	CU	1	0
28	IBD028	CU	1	0
29	IBD029	EC	2	0
30	IBD030	CU	2	0
31	IBD031	EC	1	0
32	IBD032	CU	2	1
33	IBD033	EC	1	0
34	IBD034	EC	0	2
35	IBD035	CU	1	1
36	IBD036	CU	0	0
37	IBD037	EC	1	0
38	IBD038	EC	2	0
39	IBD039	CU	0	1
40	IBD040	EC	0	1
41	IBD041	EC	1	0
42	IBD042	CU	1	1
43	IBD043	CU	0	0
44	IBD044	EC	1	0
45	IBD045	CU	1	0
46	IBD046	EC	1	0
47	IBD047	No diagnosticado	1	0
48	IBD048	EC	1	1
49	IBD049	CU	1	0
50	IBD050	EC	1	0
51	IBD051	EC	1	0
52	IBD052	EC	1	0
53	IBD053	EC	1	2
54	IBD054	EC	1	0
55	IBD055	EC	1	2
56	IBD056	No diagnosticado	1	0
57	IBD057	CU	1	0
58	IBD058	EC	1	1

59	IBD059	EC	1	0
60	IBD060	CU	1	0
61	IBD061	CU	1	0
62	IBD062	CU	1	
63	IBD063	CU	0	0
64	IBD064	CU	1	0
65	IBD065	EC	1	0
66	IBD066	EC	1	0
67	IBD067	CU	1	
68	IBD068	EC	0	0
69	IBD069	EC	1	0
70	IBD071	EC	1	
71	IBD072	EC	0	0
72	IBD073	EC	0	1
73	IBD074	CU	1	
74	IBD075	EC	1	0
75	IBD076	CU	1	0
76	IBD077	EC	0	
77	IBD078	EC	1	0
78	IBD080	CU	0	1
79	IBD081	CU	1	1
80	IBD082	EC	1	1
81	IBD083	EC	1	1
82	IBD084	EC	1	0
83	IBD085	EC	1	1
84	IBD086	CU	2	0
85	IBD087	No diagnosticado	1	0
86	IBD088	No diagnosticado	2	0
87	IBD089	No diagnosticado	1	1
88	IBD090	No diagnosticado	1	0
89	IBD091	No diagnosticado	1	0
90	IBD096	No diagnosticado	0	2
91	IBD100	CU	1	0
92	IBD101	EC	0	1
93	IBD102	No diagnosticado	1	0
94	IBD103	EC	0	0
95	IBD104	EC	1	0
96	IBD105	EC	0	0
97	IBD107	EC	1	0
98	IBD111	EC	1	0
99	IBD114	CU	1	0

100	IBD116	EC	2	0
101	IBD121	CU	0	1
102	IBD123	CU	1	0
103	IBD124	CU	0	2
104	IBD126	EC	1	0
105	IBD127	EC	2	0

PACIENTES DEL HCPA				
N	CÓDIGO DE MUESTRA	DIAGNÓSTICO	TLR9 G2848A	TLR9 T- 1237C
1	1	CU	0	1
2	2	CU	0	0
3	3	EC	1	1
4	4	EC	1	0
5	5	CU	2	0
6	6	EC	1	1
7	7	CU	2	0
8	8	CU	0	1
9	10	CU	0	0
10	11	EC	2	0
11	12	EC	1	0
12	13	EC	1	0
13	14	CU	0	0
14	15	EC	1	0
15	16	CU	1	0
16	17	EC	1	0
17	18	CU	2	0
18	19	CU	1	2
19	20	EC	0	0
20	21	EC	1	0
21	22	CU	0	0
22	23	EC	1	0
23	24	EC	2	1
24	25	EC	1	1
25	26	CU	1	0
26	27	EC	0	2
27	28	EC	0	0
28	29	CU	2	0
29	30	CU	2	1
30	31	EC	1	0

31	32	CU	1	1
32	33	EC	2	0
33	34	CU	1	1
34	35	EC	2	1
35	36	EC	1	1
36	37	CU	1	1
37	38	EC	1	0
38	39	CU	0	1
39	40	EC	0	2
40	41	CU	0	0
41	42	CU	2	0
42	43	CU	2	0
43	44	EC	2	0
44	45	EC	0	2
45	46	CU	1	0
46	47	CU	2	0
47	48	EC	1	1
48	49	CU	0	0
49	50	EC	1	0
50	51	EC	1	0
51	52	EC	1	1
52	53	EC	0	0
53	54	CU	2	0
54	55	CU	2	1
55	56	CU	1	0
56	57	EC	2	0
57	58	EC	0	0
58	59	CU	0	1
59	60	CU	2	0
60	61	EC	2	0
61	62	EC	0	1
62	63	EC	0	1
63	64	EC	1	0
64	65	CU	2	1
65	66	EC	1	0
66	67	CU	1	0
67	68	EC	2	0
68	69	EC	1	0
69	70	CU	1	0
70	71	EC	2	1
71	72	EC	1	1

72	73	CU	1	0
73	74	EC	0	1
74	75	EC	1	1
75	76	CU	0	1
76	77	CU	1	0
77	78	CU	1	0
78	79	EC	1	0
79	80	CU	1	0
80	81	CU	1	0
81	82	EC	1	0
82	83	EC	0	1
83	84	CU	0	0
84	85	CU	0	1
85	86	CU	1	0
86	87	EC	1	0
87	88	EC	2	0
88	89	EC	1	1
89	90	EC	2	0
90	91	CU	1	1
91	92	EC	0	0
92	93	CU	1	1
93	95	EC	1	1
94	96	EC	1	1
95	97	EC	0	0
96	98	CU	1	1
97	99	EC	1	0
98	100	CU	1	0
99	101	EC	0	0
100	102	CU	0	0
101	103	EC	0	1
102	104	CU	0	0
103	105	CU	1	0
104	106	CU	1	0
105	107	CU	0	1
106	108	CU	2	0
107	109	CU	1	0
108	110	CU	2	0
109	111	EC	2	0
110	112	CU	0	0
111	113	EC	0	1
112	114	CU	0	1

113	115	CU	1	0
114	116	EC	0	0
115	117	EC	1	0
116	118	CU	0	1
117	119	CU	1	0
118	120	CU	1	1
119	121	CU	1	0
120	122	CU	0	0
121	123	EC	2	0
122	124	CU	1	0
123	125	EC	1	0
124	126	EC	1	1
125	127	EC	2	0
126	128	EC	1	1
127	129	CU	0	0
128	130	EC	1	0
129	131	CU	1	0
130	132	EC	1	0
131	133	EC	1	1
132	134	EC	1	0
133	135	EC	1	1
134	136	CU	1	0
135	137	EC	1	0
136	138	CU	0	0
137	139	EC	1	0
138	140	EC	1	0
139	141	CU	0	0
140	142	CU	2	0
141	143	EC	0	0
142	144	EC	1	1
143	145	EC	1	0
144	146	CU	2	0
145	147	CU	0	2
146	148	EC	1	1
147	149	EC	0	0
148	150	EC	1	0

POBLACIÓN DE CONTROLES			
N	CÓDIGO DE MUESTRA	TLR9 G2848A	TLR9 T- 1237C
1	C1	0	1
2	C2	1	0
3	C3	0	0
4	C4	0	1
5	C6	1	0
6	C7	0	0
7	C8	0	1
8	C9	0	2
9	C10	2	0
10	C11	1	0
11	C13	0	0
12	C14	2	0
13	C15	0	1
14	C16	1	0
15	C17	1	0
16	C18	0	1
17	C19	0	2
18	C20	0	1
19	C22	0	0
20	C23	0	1
21	C24	1	0
22	C25	1	1
23	C26	1	0
24	C27	2	0
25	C28	1	0
26	C29	2	0
27	C30	0	1
28	C31	2	0
29	C32	1	0
30	C33	2	0
31	C34	2	0
32	C35	1	0
33	C36	2	0
34	C37	1	0
35	C38	0	0
36	C39	1	0

37	C40	1	0
38	C41	1	1
39	C42	2	0
40	C43	1	1
41	C44	1	1
42	C45	1	1
43	C46	1	1
44	C47	1	1
45	C48	2	1
46	C49	1	0
47	C50	2	0
48	C51	1	0
49	C52	2	0
50	C53	1	0
51	C54	1	0
52	C55	2	1
53	C56	1	1
54	C57	1	0
55	C58	1	0
56	C59	1	1
57	C60	1	0
58	C61	0	0
59	C62	2	0
60	C63	0	0
61	C64	1	0
62	C65	1	0
63	C66	0	0
64	C67	2	0
65	C68	0	0
66	C69	1	0
67	C70	0	0
68	C71	0	0
69	C72	0	1
70	C73	1	1
71	C75	1	0
72	C76	2	0
73	C77	1	1
74	C78	1	0
75	C79	1	0
76	C80	1	0
77	C81	1	0

78	C82	0	0
79	C83	2	0
80	C84	1	2
81	C85	1	0
82	C86	2	0
83	C87	0	1
84	C88	0	0
85	C89	0	1
86	C90	1	1
87	C91	0	0
88	C92	1	0
89	C93	2	0
90	C94	1	0
91	C95	muestra perdida	muestra perdida
92	C96	2	1
93	C97	0	1
94	C98	1	0
95	C99	0	1
96	C100	1	1
97	C101	2	0
98	C102	1	0
99	C103	muestra perdida	muestra perdida
100	C104	muestra perdida	muestra perdida
101	C105	1	1
102	C106	0	0
103	C110	2	0
104	C111	2	0
105	C112	1	0
106	C113	1	1
107	C114	0	0
108	C115	1	0
109	C116	1	0
110	C117	2	0
111	C118	0	0
112	C119	2	1
113	C120	0	0
114	C121	0	1
115	C122	2	0
116	C123	0	1
117	C124	1	1

118	C125	1	1
119	C126	1	0
120	C127	1	0
121	C128	2	0
122	C129	0	1
123	C130	1	1
124	C131	0	0
125	C132	1	0
126	C133	1	0
127	C134	0	0
128	C135	1	1
129	C136	1	0
130	C137	2	0
131	C138	0	1
132	C139	1	1
133	C140	2	0
134	C141	1	0
135	C142	1	0
136	C143	muestra perdida	muestra perdida
137	C144	0	0
138	C145	1	2
139	C146	1	1
140	C147	1	0
141	C148	2	0
142	C149	1	0
143	C150	0	0
144	C151	1	0
145	C152	0	1
146	C153	0	1
147	C154	1	0
148	C155	muestra perdida	muestra perdida
149	C156	1	0
150	C157	1	0
151	C158	2	1
152	C159	0	0
153	C160	1	0
154	C161	0	1
155	C162	1	0
156	C163	1	0
157	C164	2	0

158	C165	2	0
159	C166	1	0
160	C167	2	0
161	C168	0	0
162	C169	1	0
163	C170	0	1
164	C171	1	0
165	C172	1	0
166	C173	0	0
167	C174	1	0
168	C175	2	0
169	C176	2	1
170	C178	0	0
171	C179	0	0
172	C180	2	0
173	C181	1	1
174	C182	1	0
175	C183	1	0
176	C184	0	1
177	C185	1	1
178	C186	0	1
179	C187	0	0
180	C188	2	0
181	C189	1	0
182	C190	1	0
183	C191	1	1
184	C192	2	0
185	C193	2	0
186	C194	2	0
187	C195	1	1
188	C196	0	0
189	C197	2	0
190	C198	1	1
191	C199	0	0
192	C200	2	0
193	C201	1	0
194	C202	1	0
195	C203	0	0
196	C204	1	0
197	C205	0	1
198	C206	1	0

199	C207	1	0
200	C208	0	1
201	C209	2	0
202	C210	2	0
203	C211	0	0
204	C212	1	0
205	C213	0	0
206	C214	muestra perdida	muestra perdida
207	C215	1	1
208	C216	2	0
209	C217	0	2
210	C218	0	0
211	C219	0	0
212	C220	1	0
213	C221	1	0
214	C222	2	0
215	C223	2	0
216	C224	2	0
217	C225	2	0
218	C226	1	0
219	C227	0	1
220	C228	1	0
221	C229	2	0
222	C230	1	0
223	C231	muestra perdida	muestra perdida
224	C232	2	0
225	C233	2	0
226	C234	0	0
227	C235	0	1
228	C236	0	1
229	C237	1	0
230	C238	2	0
231	C239	1	0
232	C240	0	0
233	C241	1	0
234	C242	2	0
235	C243	1	0
236	C244	2	0
237	C245	2	0
238	C246	2	0

239	C247	1	0
240	C248	muestra perdida	muestra perdida
241	C249	1	0
242	C250	1	0
243	C251	0	0
244	C252	0	0
245	C253	1	0
246	C254	0	2
247	C255	0	1

11.2 ANEXO II

11.2.1 Datos clínicos de los pacientes del Hospital de la PUCRS

Nombre del paciente	Fecha de nacimiento	Edad	Sexo	Tipo de EII	Tipo de enfermedad de Crohn	Tipo de colitis ulcerativa	Edad de inicio de los síntomas
IBD01	12 de diciembre de 1977	33	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	< 16 años
IBD02	15 de diciembre de 1968	42	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD03	13 de junio de 1953	57	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD04	15 de junio de 1972	38	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD05	6 de junio de 1955	55	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo y fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD06	6 de junio de 1985	25	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD07	6 de junio de 1971	39	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD08	3 de noviembre de 1967	43	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD09	14 de octubre de 1962	48	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD10	11 de agosto de 1945	65	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	> 40 años
IBD11	2 de enero de 1964	46	F	Enfermedad de Crohn	Desconocido	-	Entre 17- 40 años
IBD12	4 de mayo de 1945	65	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD13	14 de octubre de 1978	32	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo y estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD14	15 de noviembre de 1952	58	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD15	5 de abril de 1965	45	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD16	10 de mayo de 1962	48	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD17	10 de diciembre de 1940	70	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD18	10 de marzo de 1954	56	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	> 40 años

IBD19	5 de octubre de 1947	63	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo y estenosante	-	> 40 años
IBD20	8 de octubre de 1984	26	M	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD21	5 de marzo de 1975	35	M	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD22	5 de junio de 1981	29	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD23	15 de abril de 1987	23	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	< 16 años
IBD24	9 de marzo de 1956	54	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD25	8 de julio de 1948	62	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	> 40 años
IBD26	17 de septiembre de 1968	42	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD27	15 de enero de 1983	27	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD28	28 de agosto de 1973	37	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD29	18 de agosto de 1933	77	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD30	2 de marzo de 1972	38	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD31	30 de junio de 1973	37	M	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD32	12 de marzo de 1965	45	M	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	< 16 años
IBD33	5 de mayo de 1966	44	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD34	30 de noviembre de 1977	33	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD35	25 de enero de 1964	46	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD36	5 de junio de 1989	21	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	< 16 años
IBD37	6 de febrero de 1974	36	M	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD38	9 de septiembre de 1985	25	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	< 16 años
IBD39	5 de marzo de 1933	77	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD40	Desconocido	Desconocido	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Desconocido
IBD41	5 de marzo de 1970	40	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD42	14 de abril de 1979	31	M	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD43	3 de octubre de 1983	27	M	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	< 16 años
IBD44	14 de julio de 1958	52	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD45	7 de febrero de 1954	56	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD46	10 de mayo de 1969	41	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD47	11 de agosto de 1982	28	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	Entre 17- 40 años
IBD48	5 de mayo de 1962	48	F	Enfermedad de Crohn	Desconocido	-	Entre 17- 40 años

IBD49	10 de mayo de 1974	36	F	Enfermedad de Crohn	Fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD50	15 de diciembre de 1954	56	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo y estenosante	-	> 40 años
IBD51	12 de julio de 1957	56	M	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD52	3 de febrero de 1958	52	F	Enfermedad de Crohn	Estenosante	-	Entre 17- 40 años
IBD53	10 de agosto de 1977	33	M	Enfermedad de Crohn	Desconocido	-	Entre 17- 40 años
IBD54	10 de abril de 1949	61	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo y fistulizante	-	Entre 17- 40 años
IBD55	19 de junio de 1929	81	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo	-	> 40 años
IBD56	10 de marzo de 1962	48	F	Enfermedad de Crohn	Ulcerativo y estenosante	-	> 40 años
IBD57	6 de junio de 1959	51	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD58	21 de marzo de 1976	34	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD59	2 de marzo de 1970	40	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD60	10 de agosto de 1964	46	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD61	6 de junio de 1971	39	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD62	6 de junio de 1941	69	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	> 40 años
IBD63	6 de junio de 1976	34	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD64	11 de noviembre de 1953	57	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD65	10 de mayo de 1949	61	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	> 40 años
IBD66	24 de noviembre de 1960	50	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD67	4 de febrero de 1970	40	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD68	10 de septiembre de 1973	37	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD69	5 de mayo de 1955	55	M	Colitis ulcerativa	-	Grave	> 40 años
IBD70	5 de marzo de 1968	42	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD71	5 de junio de 1966	44	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD72	28 de noviembre de 1991	19	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	< 16 años
IBD73	4 de marzo de 1970	40	M	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD74	14 de julio de 1966	44	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD75	13 de octubre de 1977	33	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD76	9 de septiembre de 1966	44	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD77	13 de enero de 1955	55	M	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD78	7 de septiembre de 1975	35	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años

IBD79	22 de junio de 1952	58	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD80	30 de enero de 1967	43	M	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD81	12 de diciembre de 1961	49	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD82	1 de marzo de 1964	46	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD83	13 de diciembre de 1973	37	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD84	13 de diciembre de 1973	37	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD85	1 de abril de 1959	51	M	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD86	21 de febrero de 1983	27	M	Colitis ulcerativa	-	Grave	< 16 años
IBD87	3 de abril de 1952	58	F	Colitis ulcerativa	-	Grave	> 40 años
IBD88	11 de noviembre de 1965	45	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD89	2 de agosto de 1931	79	M	Colitis ulcerativa	-	Grave	> 40 años
IBD90	3 de abril de 1952	58	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD91	26 de abril de 1977	33	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD92	17 de marzo de 1978	32	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD93	10 de abril de 1962	48	F	Colitis ulcerativa	-	Leve	Entre 17- 40 años
IBD94	2 de octubre de 1984	26	M	Colitis ulcerativa	-	Grave	Entre 17- 40 años
IBD95	5 de febrero de 1960	50	F	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años
IBD96	24 de marzo de 1981	29	M	Colitis ulcerativa	-	Moderado	Entre 17- 40 años

11.2.2 Datos clínicos de los pacientes del HCPA

Código del paciente	Fecha de nacimiento	Edad	Sexo	Tipo de EII	Año de inicio de los síntomas
1	28 de abril de 1971	39	Femenino	Colitis ulcerativa	2000
2	1 de marzo de 1950	60	Masculino	Colitis ulcerativa	2004
3	9 de noviembre de 1974	36	Masculino	Enfermedad de Crohn	2008
4	21 de noviembre de 1989	21	Masculino	Enfermedad de Crohn	2007
5	10 de febrero de 1963	47	Femenino	Colitis ulcerativa	2004
6	22 de octubre de 1966	44	Masculino	Enfermedad de Crohn	2001
7	4 de octubre de 1962	48	Masculino	Colitis ulcerativa	2001
8	19 de septiembre de 1978	32	Femenino	Colitis ulcerativa	2007
10	16 de diciembre de 1935	75	Masculino	Colitis ulcerativa	2005
11	16 de abril de 1973	37	Femenino	Colitis ulcerativa	2005
12	11 de septiembre de 1978	32	Masculino	Enfermedad de Crohn	2002
13	1 de diciembre de 1949	61	Masculino	Enfermedad de Crohn	2000
14	28 de enero de 1977	33	Masculino	Enfermedad de Crohn	2000
15	21 de octubre de 1982	28	Masculino	Colitis ulcerativa	2001
16	19 de mayo de 1987	23	Masculino	Enfermedad de Crohn	2000
17	19 de septiembre de 1956	54	Masculino	Colitis ulcerativa	2006
18	4 de octubre de 1962	48	Femenino	Enfermedad de Crohn	2008
19	20 de diciembre de 1970	40	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
20	15 de octubre de 1971	39	Masculino	Colitis ulcerativa	2002
21	3 de agosto de 1983	27	Masculino	Enfermedad de Crohn	2005
22	27 de enero de 1970	40	Masculino	Enfermedad de Crohn	2003
23	24 de noviembre de 1956	54	Masculino	Colitis ulcerativa	2008
24	12 de septiembre de 1966	44	Femenino	Enfermedad de Crohn	2005
25	15 de mayo de 1958	52	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
26	5 de febrero de 1979	31	Femenino	Enfermedad de Crohn	2000
27	1 de octubre de 1952	58	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
28	9 de noviembre de 1975	35	Femenino	Enfermedad de Crohn	1997
29	20 de abril de 1968	42	Femenino	Enfermedad de Crohn	2006
30	23 de marzo de 1935	75	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
31	3 de agosto de 1980	30	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
32	7 de enero de 1963	47	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
33	13 de mayo de 1945	65	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
34	4 de enero de 1953	57	Masculino	Enfermedad de Crohn	2005
35	18 de agosto de 1966	44	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
36	1 de junio de 1966	44	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
37	12 de mayo de 1949	61	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
38	20 de septiembre de 1956	54	Masculino	Colitis ulcerativa	2000
39	22 de enero de 1984	26	Femenino	Enfermedad de Crohn	1996
40	30 de septiembre de 1964	46	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
41	5 de noviembre de 1971	39	Masculino	Enfermedad de Crohn	2005
42	9 de marzo de 1977	33	Masculino	Colitis ulcerativa	2003
43	18 de abril de 1989	21	Femenino	Colitis ulcerativa	2007
44	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Colitis ulcerativa	Desconocido

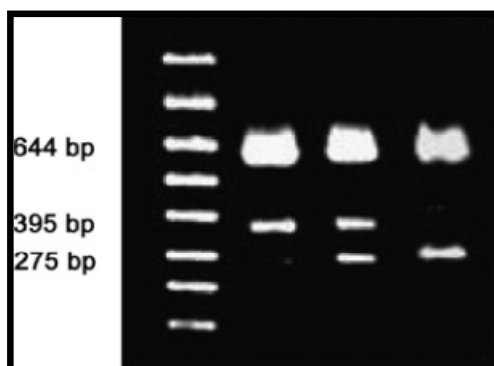
45	4 de mayo de 1968	42	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
46	6 de agosto de 1948	62	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
47	2 de abril de 1965	45	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
48	21 de julio de 1968	42	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
49	10 de junio de 1948	62	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
50	29 de septiembre de 1963	47	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
51	12 de septiembre de 1971	39	Femenino	Enfermedad de Crohn	2000
52	8 de octubre de 1956	54	Femenino	Enfermedad de Crohn	2005
53	29 de agosto de 1987	23	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
54	18 de abril de 1973	37	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
55	10 de diciembre de 1946	64	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
56	1 de enero de 1963	47	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
57	14 de septiembre de 1950	60	Masculino	Colitis ulcerativa	2006
58	3 de abril de 1949	61	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
59	15 de noviembre de 1969	41	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
60	3 de abril de 1954	56	Femenino	Colitis ulcerativa	2006
61	5 de febrero de 1963	47	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
62	25 de febrero de 1972	38	Masculino	Enfermedad de Crohn	1994
63	8 de agosto de 1981	29	Femenino	Enfermedad de Crohn	2006
64	6 de junio de 1963	47	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
65	1 de octubre de 1947	63	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
66	14 de marzo de 1962	48	Femenino	Colitis ulcerativa	1994
67	16 de octubre de 1969	41	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
68	8 de junio de 1956	54	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
69	18 de agosto de 1974	36	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
70	20 de julio de 1949	61	Masculino	Enfermedad de Crohn	2007
71	27 de enero de 1984	26	Femenino	Colitis ulcerativa	2003
72	5 de febrero de 1951	59	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
73	12 de diciembre de 1985	25	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
74	26 de agosto de 1966	44	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
75	11 de julio de 1966	44	Femenino	Enfermedad de Crohn	1998
76	7 de febrero de 1988	22	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
77	22 de agosto de 1951	59	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
78	26 de septiembre de 1956	54	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
79	26 de octubre de 1963	47	Masculino	Colitis ulcerativa	1995
80	28 de agosto de 1942	68	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
81	13 de abril de 1966	44	Femenino	Colitis ulcerativa	2003
82	3 de julio de 1953	57	Masculino	Colitis ulcerativa	2001
83	2 de marzo de 1972	38	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
84	31 de agosto de 1971	39	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
85	20 de abril de 1971	39	Femenino	Colitis ulcerativa	2003
86	7 de noviembre de 1974	36	Femenino	Colitis ulcerativa	2005
87	18 de octubre de 1960	50	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
88	15 de julio de 1964	46	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
89	15 de julio de 1950	60	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
90	15 de mayo de 1965	45	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido

91	3 de septiembre de 1980	30	Femenino	Enfermedad de Crohn	2005
92	19 de agosto de 1978	32	Desconocido	Colitis ulcerativa	Desconocido
93	14 de mayo de 1975	35	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
95	9 de mayo de 1978	32	Femenino	Colitis ulcerativa	2006
96	29 de enero de 1971	39	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
97	19 de julio de 1988	22	Masculino	Enfermedad de Crohn	2006
98	7 de noviembre de 1949	61	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
99	13 de marzo de 1985	25	Masculino	Enfermedad de Crohn	2004
100	5 de julio de 1961	49	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
101	26 de enero de 1982	28	Femenino	Enfermedad de Crohn	2003
102	19 de febrero de 1969	41	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
103	8 de septiembre de 1977	33	Masculino	Enfermedad de Crohn	2001
104	12 de febrero de 1990	20	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
105	19 de mayo de 1985	25	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
106	16 de julio de 1958	52	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
107	17 de julio de 1972	38	Femenino	Colitis ulcerativa	1992
108	20 de enero de 1959	51	Femenino	Colitis ulcerativa	2005
109	11 de abril de 1969	41	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
110	5 de mayo de 1959	51	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
111	26 de enero de 1955	55	Femenino	Colitis ulcerativa	2004
112	20 de abril de 1959	51	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
113	1 de marzo de 1956	54	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
114	17 de enero de 1979	31	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
115	15 de febrero de 1979	31	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
116	31 de enero de 1944	66	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
117	11 de diciembre de 1969	41	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
118	17 de mayo de 1985	25	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
119	16 de marzo de 1959	51	Femenino	Enfermedad de Crohn	2005
120	25 de febrero de 1951	59	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
121	28 de abril de 1934	76	Masculino	Colitis ulcerativa	Desconocido
122	24 de abril de 1957	53	Femenino	Colitis ulcerativa	2003
123	27 de febrero de 1964	46	Masculino	Colitis ulcerativa	2007
124	6 de octubre de 1984	26	Femenino	Colitis ulcerativa	1991
125	11 de julio de 1987	23	Masculino	Enfermedad de Crohn	2004
126	4 de julio de 1973	37	Femenino	Colitis ulcerativa	1999
127	24 de abril de 1946	64	Masculino	Enfermedad de Crohn	2005
128	6 de diciembre de 1958	52	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
129	24 de abril de 1947	63	Masculino	Enfermedad de Crohn	2008
130	15 de abril de 1953	57	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
131	18 de octubre de 1950	60	Masculino	Colitis ulcerativa	2005
132	27 de enero de 1992	18	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
133	18 de julio de 1971	39	Femenino	Colitis ulcerativa	2004
134	13 de diciembre de 1952	57	Masculino	Enfermedad de Crohn	2003
135	21 de agosto de 1977	32	Masculino	Enfermedad de Crohn	1999
136	28 de diciembre de 1978	31	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
137	3 de enero de 1951	59	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido

138	23 de enero de 1972	38	Femenino	Colitis ulcerativa	1996
139	5 de agosto de 1950	59	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
140	1 de octubre de 1945	64	Femenino	Colitis ulcerativa	Asintomatico
141	21 de julio de 1978	31	Femenino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
142	14 de diciembre de 1981	28	Femenino	Enfermedad de Crohn	Asintomatico
143	10 de octubre de 1971	39	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
144	25 de noviembre de 1981	29	Masculino	Colitis ulcerativa	1997
145	8 de abril de 1983	27	Masculino	Enfermedad de Crohn	2003
146	2 de febrero de 1966	44	Femenino	Enfermedad de Crohn	2006
147	8 de marzo de 1967	43	Masculino	Enfermedad de Crohn	1995
148	21 de agosto de 1977	32	Femenino	Colitis ulcerativa	Desconocido
149	9 de julio de 1976	34	Femenino	Colitis ulcerativa	2007
150	14 de septiembre de 1957	52	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido
151	27 de julio de 1958	51	Masculino	Enfermedad de Crohn	1989
152	23 de octubre de 1979	30	Femenino	Enfermedad de Crohn	Asintomatico
153	12 de agosto de 1948	61	Masculino	Enfermedad de Crohn	Desconocido

11.3 ANEXO III

11.3.1 Patrón de bandas por BI-PASA para el polimorfismo T-1237C



BIPASA: Patrón de genotipos para el polimorfismo T-1237C. En los carriles 4, 3 y 2, observamos los genotipos: homocigoto mutante (275pb), heterocigoto (395pb y 275pb) y al homocigoto salvaje (395pb), respectivamente. En el carril 1, observamos el marcador de peso molecular de 100pb. En todos los casos observamos el alelo específico (644pb) del gen *TLR9* (Carvalho *et al.*, 2007).